

DNA-katalysierte Acyltransferreaktionen:
Ein neuer Ansatz zur Generierung von bioaktiven Peptiden

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Anne Adams, geb. Erben

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Prof. Dr. Oliver Seitz

2. Prof. Dr. Christoph Arenz

Eingereicht am: 24.01.2012

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis von Prof. Dr. Oliver Seitz am Institut für Chemie im Fachinstitut für Organische und Bioorganische Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin von November 2007 bis Juni 2011 angefertigt.

Inhalt

1	EINLEITUNG	1
2	STAND DER FORSCHUNG.....	3
2.1	NUKLEINSÄUREGESTEUERTE THERAPIE VON KRANKHEITEN.....	4
2.1.1	<i>RNA-gesteuerte Regulation der Genexpression</i>	<i>4</i>
2.1.2	<i>Nukleinsäuregesteuerte Kontrolle der Proteinaktivität</i>	<i>5</i>
2.1.3	<i>Nukleinsäuregesteuerte Freisetzung von Wirkstoffmolekülen</i>	<i>7</i>
2.1.4	<i>Nukleinsäuregesteuerter Aufbau von Wirkstoffen</i>	<i>15</i>
2.2	PNA UND PNA-PEPTID-KONJUGATE.....	19
2.3	SMAC – EIN PEPTID IN DER KREBSTHERAPIE	22
2.3.1	<i>Apoptose.....</i>	<i>22</i>
2.3.2	<i>Smac wirkt als XIAP-Antagonist.....</i>	<i>24</i>
3	ZIELSETZUNG	27
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	30
4.1	ENTWICKLUNG EINES BINDUNGSASSAYS	30
4.1.1	<i>Auswahl geeigneter Peptid-PNA-Konjugate.....</i>	<i>30</i>
4.1.2	<i>Expression des BIR3-Proteins</i>	<i>33</i>
4.1.3	<i>BIR3-Bindungsassay basierend auf Fluoreszenzintensität</i>	<i>33</i>
4.1.4	<i>BIR3-Bindungsassay basierend auf Fluoreszenzanisotropie</i>	<i>38</i>
4.2	TRANSFERREAKTION IN GEGENWART VON BIR3	46
4.3	STABILITÄT DER PEPTID-PNA-KONJUGATE	50
4.3.1	<i>Synthese von FAM-markierten Smac-Peptiden und Peptid-PNA-Konjugaten</i>	<i>50</i>
4.3.2	<i>Untersuchung der Stabilität in Zelllysate.....</i>	<i>52</i>
4.3.3	<i>Smac-Peptide mit D-Aminosäuren</i>	<i>55</i>
4.4	CASPASE-ASSAY	56
4.4.1	<i>Caspase-Assay mit Kit.....</i>	<i>57</i>
4.4.2	<i>Caspase-Assay in Zelllysate.....</i>	<i>63</i>
4.5	SYNTHESE VON PEGYLIERTEN KONJUGATEN	73
4.5.1	<i>Konjugation mit polydispersem PEG.....</i>	<i>75</i>
4.5.2	<i>Konjugation mit monodispersem PEG</i>	<i>78</i>
4.6	DISKUSSION	84
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	87
5.1	ZUSAMMENFASSUNG	87

5.2	AUSBLICK.....	93
6	EXPERIMENTELLER TEIL.....	96
6.1	MESSGERÄTE UND HILFSMITTEL	96
6.2	ALLGEMEINE VORSCHRIFT FÜR DIE FESTPHASENSYNTHESE VON PEPTIDEN UND PEPTID-PNA-KONJUGATEN	99
6.2.1	Beladung der Harze	99
6.2.2	Protokolle zur manuellen Peptid-PNA-Synthese.....	100
6.2.3	Automatisierte Festphasensynthese von Peptid-PNA-Konjugaten.....	101
6.3	EXPERIMENTE ZU KAPITEL 4.1	101
6.3.1	Expression des BIR3-Proteins	101
6.3.2	Gelchromatographie.....	105
6.3.3	BIR3-Bindungsassay basierend auf Fluoreszenzintensität	106
6.3.4	BIR3-Bindungsassay basierend auf Fluoreszenzanisotropie	109
6.4	EXPERIMENTE ZU KAPITEL 4.2	111
6.4.1	Reaktionsverfolgung am Plattenleser	111
6.4.2	Reaktionsverfolgung am Fluoreszenzspektrometer	112
6.4.3	Reaktionsverfolgung mittels HPLC	112
6.5	EXPERIMENTE ZU KAPITEL 4.3	113
6.5.1	Synthese von fluoreszenzmarkierten Peptid-PNA-Konjugaten.....	113
6.5.2	HeLa-Zellkulturen.....	116
6.5.3	Gewinnung von HeLa-Zelllysate.....	116
6.5.4	Untersuchung der Stabilität in Zelllysate.....	116
6.5.5	Synthese von Smac-Peptiden mit D-Aminosäuren.....	117
6.5.6	IC ₅₀ -Messungen im Plattenleser.....	118
6.6	EXPERIMENTE ZU KAPITEL 4.4	118
6.6.1	Caspase-Assay mit kommerziell erhältlichem Kit	119
6.6.2	Caspase-Assay mit Citrat-Puffer.....	120
6.6.3	Caspase-Assay in Zelllysate.....	121
6.7	EXPERIMENTE ZU KAPITEL 4.5	122
6.7.1	Versuche zur Konjugation mit dem polydispersen PEG-Succinimidylester 102	122
6.7.2	Versuche zur Konjugation mit dem monodispersen PEG-Succinimidylester 110	123
6.7.3	Synthese des PEGylierten Thioester-Peptid-PNA-Konjugats 123	126
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	128
8	ANHANG.....	137
8.1	HPLC-CHROMATOGRAMME UND REAKTIONSKINETIK ZUR REAKTION VON 58A UND 59A	137
8.2	VOREXPERIMENT ZUR BESTIMMUNG DER IC ₅₀ -WERTE MITTELS FLUORESCENZANISOTROPIE	138
8.3	STABILITÄT VON 76A IN ZELLYSAT	138

8.4	IC ₅₀ -BESTIMMUNG FÜR DIE INHIBIERUNG VON CASPASE-9 UND CASPASE-3 DURCH BIR3.....	138
8.5	ANALYTIK DER SYNTHETISIERTEN PEPTIDE UND PEPTID-PNA-KONJUGATE	139
8.6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	145
DANKSAGUNG		149
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG		150

1 Einleitung

Die DNA-Doppelhelix ist aus zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden aufgebaut, die antiparallel über die Watson-Crick Basenpaare Adenin-Thymin und Guanin-Cytosin miteinander wechselwirken.^[1,2] Diese Interaktion erlaubt die spezifische Erkennung komplementärer Oligonukleotide und ist die Grundlage für wesentliche zelluläre Prozesse wie der Replikation, Transkription und Translation sowie der Genregulation. So dient während der Replikation jeweils einer der DNA-Stränge als Schablone (Templat) für die enzymatisch katalysierte Synthese eines neuen DNA-Moleküls. Bei dem Prozess der Transkription wird an einem DNA-Templat ein komplementäres RNA-Molekül generiert. Die spezifische Hybridisierung der reaktiven Aminoacyl- und Peptidyl-tRNA mit dem mRNA-Templat ermöglicht während der Translation die Knüpfung von Peptidbindungen und damit den Aufbau von Proteinen (Abbildung 1). Über die biologische Relevanz von Nukleinsäuretemplat-kontrollierten Reaktionen hinaus, sind diese seit einigen Jahren auch für Chemiker von Interesse. Die basenspezifische Hybridisierung von Oligonukleotiden ermöglicht die Anordnung zweier reaktiver Gruppen in räumlicher Nähe, wodurch die effektive Molarität der Reaktionspartner erhöht und eine Reaktion zwischen ihnen beschleunigt werden kann.

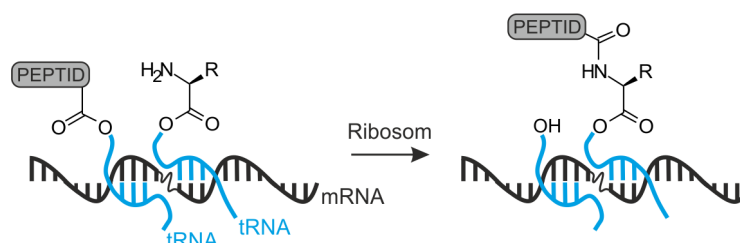


Abbildung 1: RNA-Templat-kontrollierte Bindungsknüpfung während der Peptidsynthese (nach^[3]).

Erste Versuche dieses Prinzip in der chemischen Synthese anzuwenden, beschränkten sich auf die chemische Ligation von Oligonukleotiden oder analogen Strukturen.^[4] Später wurde die Methode besonders von *Liu* und seinen Mitarbeitern auf die DNA-gesteuerte Synthese von organischen Verbindungen übertragen.^[3] Seitdem wurde eine Vielzahl von chemischen Reaktionen an DNA-Templaten durchgeführt. Sie dienen zum Aufbau von zwei- und dreidimensionalen Nanostrukturen sowie von Molekülbibliotheken.^[5–8] Ebenso erlaubt dieser Ansatz die sequenzspezifische Modifizierung von RNA oder DNA.^[9–11] Für solche Anwendungen werden meist speziell entworfene, synthetische DNA- oder RNA-Sequenzen verwendet, die als Templat die Anordnung

Einleitung

der funktionellen Gruppen in den entsprechenden Molekülen ermöglichen. Einer interessanten Idee zufolge könnten aber auch natürliche, zellendogene Nukleinsäuren als Template die Bildung von Komplexen ermöglichen, die in intrazelluläre Protein-Protein-Wechselwirkungen eingreifen.^[12,13] Die templatgesteuerte chemische Synthese findet auch Anwendung beim selektiven Nachweis von natürlichen Nukleinsäuren.^[14–18] Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist die Detektion von genetischen Veränderungen im menschlichen Genom, die oft ursächlich für das Auftreten einer Krankheit verantwortlich sind. Ein schneller, sensitiver Nachweis ermöglicht individuell zugeschnittene, bei frühzeitiger Diagnose, sogar präventive Therapien. Darüber hinaus könnten Systeme, welche die exprimierte RNA in einer Zelle nicht nur analysieren, sondern die gewonnene Information dazu nutzen, die Bildung oder Freisetzung von Wirkstoffen auszulösen, neue, personalisierte Therapiemöglichkeiten eröffnen.^[19,20]

2 Stand der Forschung

DNA speichert und überträgt als molekulares Templat genetische Information mittels der spezifischen Watson-Crick-Basenpaarung und nimmt damit eine entscheidende Rolle bei intrazellulären Prozessen ein. Zunehmend werden aber auch synthetische Systeme entwickelt, die die Selektivität und Programmierbarkeit der Basenerkennung nutzen. Mittels etablierter automatischer Synthese kann praktisch jede beliebige DNA-Sequenz erhalten und modifiziert werden. So wird die Eigenschaft von Nukleinsäuren zur Selbstorganisation z. B. für die Konstruktion von Nanomaterialien genutzt.^[21–23] Auch die Generierung von Hybridmolekülen, in denen die Nukleinsäuresequenzen die Lokalisierung, Anordnung oder Konformation von gebundenen Molekülen bestimmen, ist denkbar.^[12,24–26] Zu diesem Zweck wurden Peptide, Proteine, Saccharide oder kleine Moleküle mit Nukleinsäuren konjugiert. Bei der DNA-gestützten organischen Synthese wird die Reaktivität synthetischer Moleküle durch Modulation der effektiven Konzentration der Reaktanten gesteuert. Da die Produktbildung bevorzugt nur in Gegenwart eines komplementären Templates erfolgen kann, eignen sich solche nukleinsäuregesteuerten Reaktionen zur Detektion spezifischer Nukleinsäuresequenzen.^[16,27] Andererseits führte die DNA-gestützte Synthese auch zur Entdeckung neuer organischer Reaktionen.^[27–31] Hierbei wurde ausgenutzt, dass die Reaktionsprodukte durch die angehängte DNA-Sequenz auch aus einem Reaktionsgemisch heraus eindeutig identifizierbar sind. Durch *in vitro* Auslese, anschließender PCR-Amplifizierung und DNA-Sequenzierung sind Prinzipien der Evolution auf die Synthese von funktionalen Molekülen und synthetischen Polymeren anwendbar und könnten die Entdeckung und Optimierung neuer Wirkstoffe ermöglichen.^[5,32] Seit einigen Jahren gibt es aber auch Ansätze nach denen endogene Nukleinsäuren dazu genutzt werden könnten, Wirkstoffe intrazellulär und damit direkt an ihrem Wirkort zu erzeugen.^[19,33] Denn die Ursache vieler Krankheiten sind genetische Defekte, die angeboren sind oder durch Umwelteinflüsse oder Viren verursacht sein können.^[34] Dabei ist Krebs die am weitesten verbreitete genetische Erkrankung. Ein wichtiges Ziel in der Behandlung von Krebs ist die selektive Zerstörung der erkrankten Zellen, ohne gesundes Gewebe zu schädigen. Individuelle genetische Unterschiede bewirken einerseits, dass Patienten unterschiedlich auf Therapien ansprechen. Andererseits können Veränderungen in den Genen einer Krebszelle, dazu führen, dass diese gegenüber den üblichen Zytostatika resistent wird. Daher wird heutzutage zunehmend an der Entwicklung einer personalisierten Medizin geforscht, die es erlaubt Therapien,

basierend auf der spezifischen genetischen Information eines Patienten, individuell anzupassen.^[35] Ein interessanter Ansatz geht davon aus, dass die RNA-Information in einer Zelle für die gezielte Therapie von erkrankten Zellen genutzt werden könnte. Dabei würden individuelle und krankheitsspezifische Nukleinsäuren eine therapeutische Antwort auslösen und damit eine selektive und personalisierte Medizin ermöglichen.

2.1 Nukleinsäuregesteuerte Therapie von Krankheiten

2.1.1 RNA-gesteuerte Regulation der Genexpression

Benenson *et al.* näherten sich dem Problem mit der Entwicklung eines molekularen Computers, der eine Krankheit auf Grund der Anwesenheit einer spezifischen mRNA diagnostizieren und als Antwort einen Wirkstoff freisetzen kann (Abbildung 2). Dabei beruhte die Diagnose auf der hybridisierungsbasierten Erkennung kurzer krankheitsspezifischer mRNA-Sequenzen mittels Nukleinsäuresonden und die Therapie auf der Freisetzung kurzer antisense-DNA-Einzelstränge, welche die Expression eines Zielproteins inhibieren.^[20,36] Shapiro *et al.* erweiterten das Konzept des molekularen Computers wie oben beschrieben so, dass verschiedenste Krankheitsindikatoren für die programmierbare Freisetzung von RNAi-basierten Wirkstoffen dienen können. So konnten miRNAs (microRNAs), kleine Moleküle wie ATP oder DNA-bindende Proteine von RNA-Sonden detektiert werden und lösten eine RNAi-Antwort aus.^[37]

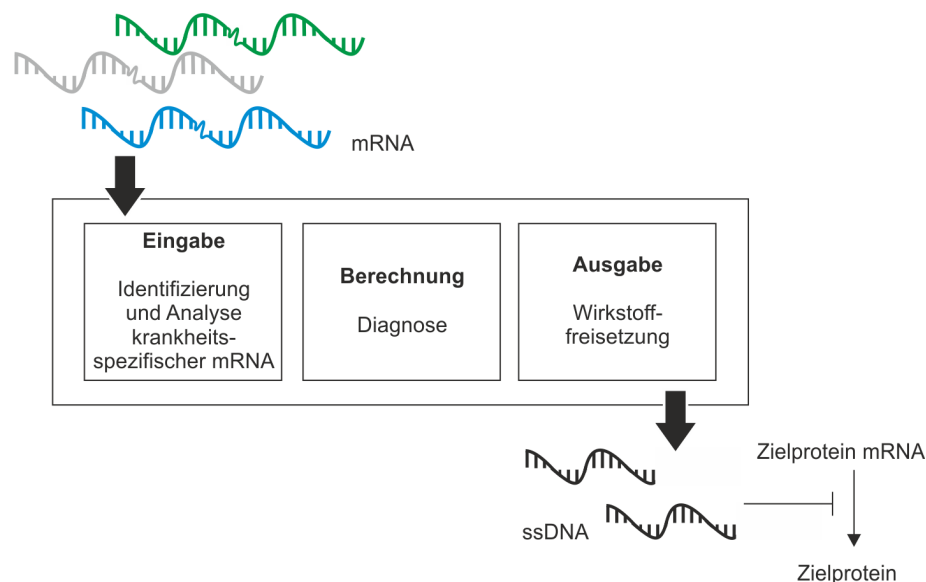


Abbildung 2: Konzept eines molekularen Computers zur Detektion von krankheitsspezifischen Genen und programmierter RNAi-basierter Wirkstofffreisetzung (ssDNA = Einzelstrang-DNA).

Die Gruppe um Sando stellte einen ähnlichen Ansatz vor. Sie verwendeten haarnadelförmige RNA-Strukturen, deren Stammregion eine Sequenz für den sense-Strang einer siRNA (*small interfering RNA*) und in der Schleife die Sequenz für die Erkennung einer Trigger-RNA enthält (Abbildung 3).^[38] In Abwesenheit der Trigger-RNA ist die Stammregion der Haarnadel geschlossen. Bei Anwesenheit der Trigger-RNA hybridisiert diese an der Erkennungssequenz und die Haarnadel wird geöffnet. Dadurch kann eine antisense-siRNA hybridisieren. Die kurze doppelsträngige RNA wird vom Enzym Dicer erkannt und schließlich die Ziel-mRNA durch die Endonukleasefunktion von Dicer abgebaut. Die Forscher konnten das Konzept in HeLa-Zellen anwenden. Dabei diente die inverse Sequenz der kodierenden Region 498 – 532 der humanen cfos-mRNA als Trigger-RNA, mit deren Hilfe die Expression von Leuchtkäfer-Luziferase reguliert wurde. Nur in Anwesenheit der passenden cfos-mRNA wurde der RNAi-Mechanismus aktiviert und die Aktivität des Luziferase-Zielproteins vermindert. Bei Verwendung von nicht-komplementärer reverser cfos-mRNA wurde das Luziferase-Gen nicht ausgeschaltet. Damit konnte ein Zielprotein abhängig von der Sequenz der Trigger-RNA reguliert werden. Diese und andere Gruppen haben weitere RNA-basierte Ansätze zur Kontrolle von Proteinfunktionen vorgestellt. So konnten An *et al.* RNAi mittels Theophyllin-bindender, intrazellulär transkribierter Aptamere induzieren.^[39]

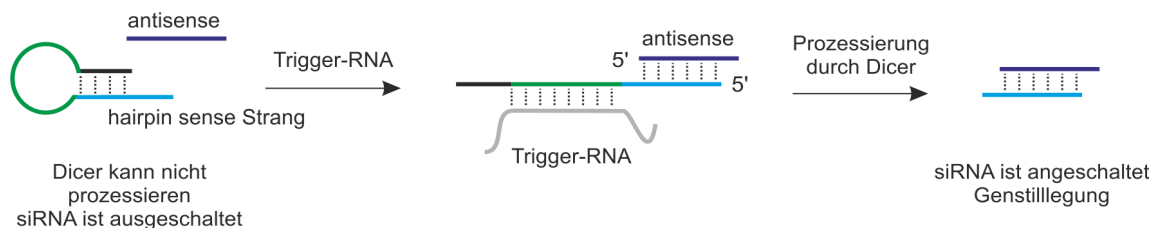


Abbildung 3: Hybridisierungsgesteuerte Aktivierung eines siRNA-Systems.

Die beschriebenen Konzepte bieten Ansätze für programmierbare, personalisierte Therapien, indem krankheitsspezifische Indikatoren zur Freisetzung von Wirkstoffmolekülen führen. Auch krankheitsspezifische RNA konnte in den beschriebenen Modelluntersuchungen eine Therapieantwort auslösen. Dabei adressierten die Wirkstoffmoleküle ebenfalls Nukleinsäuren und beeinflussten die Genexpression.

2.1.2 Nukleinsäuregesteuerte Kontrolle der Proteinaktivität

Ein weiterer Ansatz beschäftigt sich mit der Entwicklung von DNA- oder RNA-gesteuerten Molekülen für die Regulation von Zielproteinen in einer erkrankten Zelle. Die Aktivität der Moleküle könnte dann durch die Anwesenheit einer spezifischen DNA- oder RNA-Sequenz in der Zelle

geschaltet werden. So wird über die programmierte Selbstorganisation von Nukleinsäure-Peptid-Konjugaten die Aktivität der gebundenen Peptide kontrolliert. Sind diese Liganden für ein zu untersuchendes Protein, ermöglicht dies die Kontrolle über die Funktion der Zielproteine. Beispielsweise wurden DNA-Peptid-Konjugate entwickelt, die auf das Onkoprotein cJun gerichtet sind.^[40] Dieses Protein wechselwirkt mit cFos und bildet ein Heterodimer, welches eine Leucin-Zipper-Domäne aufweist, die wiederum doppelsträngige DNA erkennt. Dieser Transkriptionsfaktor spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und dem Tumorwachstum. Daher könnte die Inhibierung von cJun einen Ansatz für neue Krebstherapien liefern. Portela *et al.* konstruierten ein DNA-Peptid-Konjugat **1**, welches aus einem von cFos abgeleiteten 35mer Peptid und einem kurzen DNA-Oligomer besteht (Abbildung 4). Die Hybridisierung dieses Konjugates mit einer komplementären DNA-Sequenz führte zu doppelsträngigen Hybriden wie in **2**. Diese konnten, im Gegensatz zu den einzelsträngigen Konstrukten, selektiv cJun binden, wodurch die Affinität des Transkriptionsfaktors mittels DNA-Erkennung kontrolliert werden konnte.



Abbildung 4: DNA-Peptid-Konjugat zur Adressierung des Transkriptionsfaktors cJun. Hybridisierung führt zur Ausbildung eines doppelsträngigen Hybrids **2**, welches cJun bindet.^[25,40]

Nukleinsäurehybridisierung ermöglichte auch die Kontrolle über Funktionen von Proteinen, die nicht mit Nukleinsäuren wechselwirken.^[41,42] Dazu wurden Konjugate verwendet, in denen ein Peptid zwischen zwei PNA-Sequenzen verankert ist (**3** in Abbildung 5). Es konnte gezeigt werden, dass die Konformation des eingebetteten Peptids mittels intra- und intermolekularer Hybridisierung verändert und damit die Affinität des Peptids zu einem Zielprotein eingestellt werden kann. In einer Grundlagenuntersuchung wurde dieses Prinzip für die Schaltung der Affinität eines Phosphopeptids zur SH2-Domäne der Proteinkinase Src gezeigt. Das Protein erkennt die Phosphopeptidliganden in einer gestreckten Konformation. Diese liegt in den Duplexen des PNA-Peptid-PNA-Hybrids **3** mit der teilweise komplementären DNA2 vor. Im einzelsträngigen Konjugat **3** sind mehrere Konformationen des Peptids möglich und es liegt wahrscheinlich nur ein kleiner Teil gestreckt vor. Daher ist die Affinität von **3** zur Src-Kinase klein. Die Hybridisierung mit DNA1 zwingt das Peptid in eine schlaufenartige Struktur. Der vorliegende Komplex hat eine noch geringere Affinität als **3** allein. Zwischen diesen Zuständen konnte durch Zugabe einer

dritten DNA-Sequenz geschaltet werden. Mit diesem Ansatz konnte *in vitro* die enzymatische Aktivität der Src-Kinase auch mittels RNA-Hybridisierung kontrolliert werden.^[41]

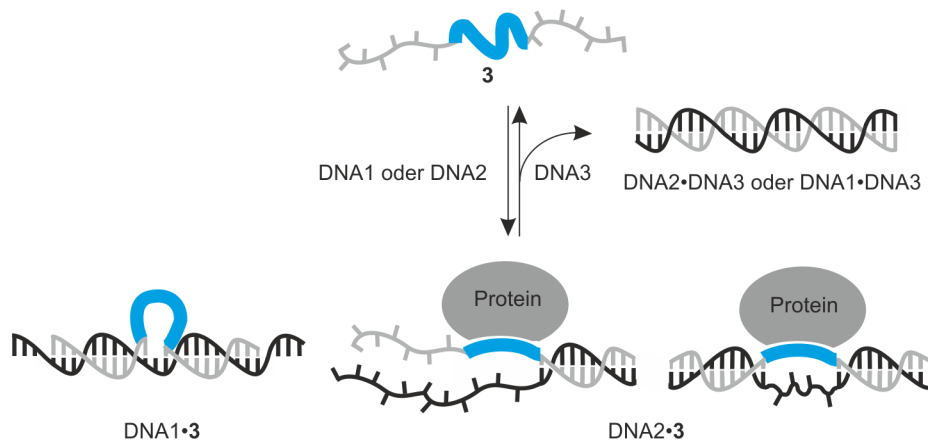


Abbildung 5: Hybridisierungsvermittelte Kontrolle der Peptidkonformation.^[41,42]

Die Verknüpfung von Proteinliganden mit Nukleinsäuren ermöglichte demnach die hybridisierungsvermittelte Kontrolle von Zielproteinen. Dieses Prinzip könnte bei der Untersuchung und der örtlich und zeitlich kontrollierten Regulation von Signaltransduktionswegen in Zellen genutzt werden, wenn die Anwesenheit einer spezifischen zellendogenen RNA bestimmte Peptid-Protein- oder Protein-Protein-Wechselwirkungen auslöst.

2.1.3 Nukleinsäuregesteuerte Freisetzung von Wirkstoffmolekülen

In der chemotherapeutischen Behandlung von Krebs werden zunehmend auch sogenannte *pro-drugs*, also nicht-toxische Wirkstoffvorstufen eingesetzt, um die Effizienz und Selektivität der Medikamente zu erhöhen. Die physikochemischen Eigenschaften eines Wirkstoffes werden dabei temporär so verändert, dass dessen Wirkung, aber auch dessen Toxizität, vermindert wird. Erst am Wirkort wird der Wirkstoff aus dem Derivat freigesetzt. Da Tumorzellen oft spezifische Antigene, Rezeptoren oder Transporterpeptide überexprimieren, können diese durch Antikörper, Peptide, Aptamere oder kleine Moleküliganden adressiert werden, die wiederum mit dem eigentlichen Wirkstoff konjugiert werden.^[43,44] Eine viel versprechende Möglichkeit bietet die über Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen vermittelte enzymatische Aktivierung von Wirkstoffen im Tumorgewebe (ADEPT, *antibody-directed enzyme prodrug therapy*).^[45,46] Dabei werden Antikörper-Enzym-Konjugate verwendet, die an spezifische Antigene der Krebszellen binden können. Anschließend können milde Wirkstoffvorstufen effizienter Zytostatika verabreicht werden, die nur innerhalb des Tumorgewebes durch die zuvor gebundenen Enzyme aktiviert werden. Einen interessanten Ansatz für die spezifische Freisetzung eines Wirkstoffs stellten Taylor *et al.* kürzlich vor

(Abbildung 6).^[47] Sie verwendeten ein DNA-Insulin-Konjugat **6**, das wie in **4** über Watson-Crick-Wechselwirkungen an ein DNA-Aptamer hybridisierte und damit inaktiviert wurde. Das DNA-Aptamer bindet spezifisch das kleine Molekül Chinin. Wenn dieses Molekül vom Aptamer gebunden **5** wird, dann wird das DNA-Insulin-Konjugat, und damit Insulin, freigesetzt. Die Freisetzung des aktiven Peptids kann unterbunden werden, indem wie in **7** ein zum Aptamer komplementäres Oligonukleotid die Bindung von Chinin verhindert.

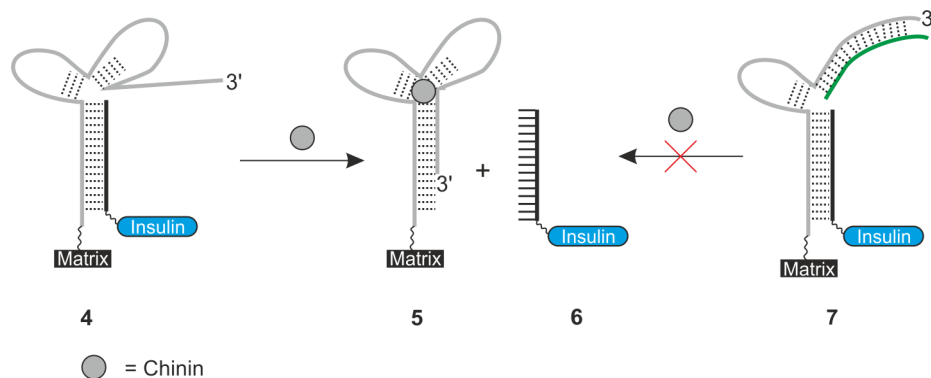


Abbildung 6: Chinin-aktivierte Freisetzung eines DNA-Insulin-Konjugats aus einem Aptamer-Komplex, sowie Blockierung der Freisetzung durch eine Inhibitor-DNA (grün).^[47]

Auch eine in Krebszellen einzigartige oder überexprimierte Nukleinsäuresequenz könnte als Stimulus für die Freisetzung oder Bildung von Wirkstoffen dienen, die an eine komplementäre Erkennungssequenz gebunden sind.^[19,48] So könnten z. B. Komplikationen auf Grund von Mutationen, Resistenz oder genetischer Unterschiede zwischen den individuellen Patienten durch den Austausch der Erkennungssequenz umgangen werden. Da das Fernziel eines solchen Konzepts eine intrazelluläre Anwendung ist, sollte die Erkennung sensitiv gegenüber einer geringen Konzentration der Zielsequenz sein und selektiv, d. h. nur in Gegenwart einer perfekt komplementären Sequenz erfolgen. Bisher wurden vor allem zwei Strategien vorgestellt, wobei Wirkstoffmoleküle an einem Nukleinsäuretemplat mittels einer chemischen Reaktion oder durch Licht induziert freigesetzt wurden.^[19]

Nukleinsäuregesteuerte Freisetzung eines Wirkstoffes mittels Licht

Die sogenannten *Hairpin Molecular Beacons* werden zur spezifischen Detektion von Nukleinsäuren *in vitro* aber auch zur mRNA-Detektion in lebenden Zellen eingesetzt.^[49,50] Tanabe *et al.* haben basierend auf dem Konzept der *Molecular Beacons* haarnadelförmige DNA-Oligonukleotide synthetisiert, die photoaktive funktionelle Gruppen tragen. Im *Molecular Beacon* **8** wurde am 3'-Ende ein Phenacylester **13** als photospaltbare Gruppe und am 5'-Ende ein Naphthalen **14** als Löscher

angebracht (Abbildung 7). Daher war im geschlossenen Zustand die Molekülfreisetzung aus dem Phenacylester unterdrückt. Bei Hybridisierung mit einer komplementären Ziel-DNA öffnete sich die Haarnadel, wodurch sich die photoaktive Gruppe und der Löscher voneinander entfernten. Bei Photoaktivierung wurde Biotin (blau in **13**) als Modellwirkstoff aus dem Phenacylester **13** freigesetzt. Die Gruppe konnte zeigen, dass die hybridisierungsbasierte Freisetzung eines Wirkstoffes auch einzelbasenselektiv erfolgte. In dieser Studie verwendeten sie Haarnadeloligonukleotide mit einer 1-Aminonaphthaleneinheit **12** als Löscher und einem O-Nitrobenzylchromophor **11** als photoreaktiver Gruppe. Als Modellwirkstoff wurde Benzoesäure (blau in **11**) freigesetzt.

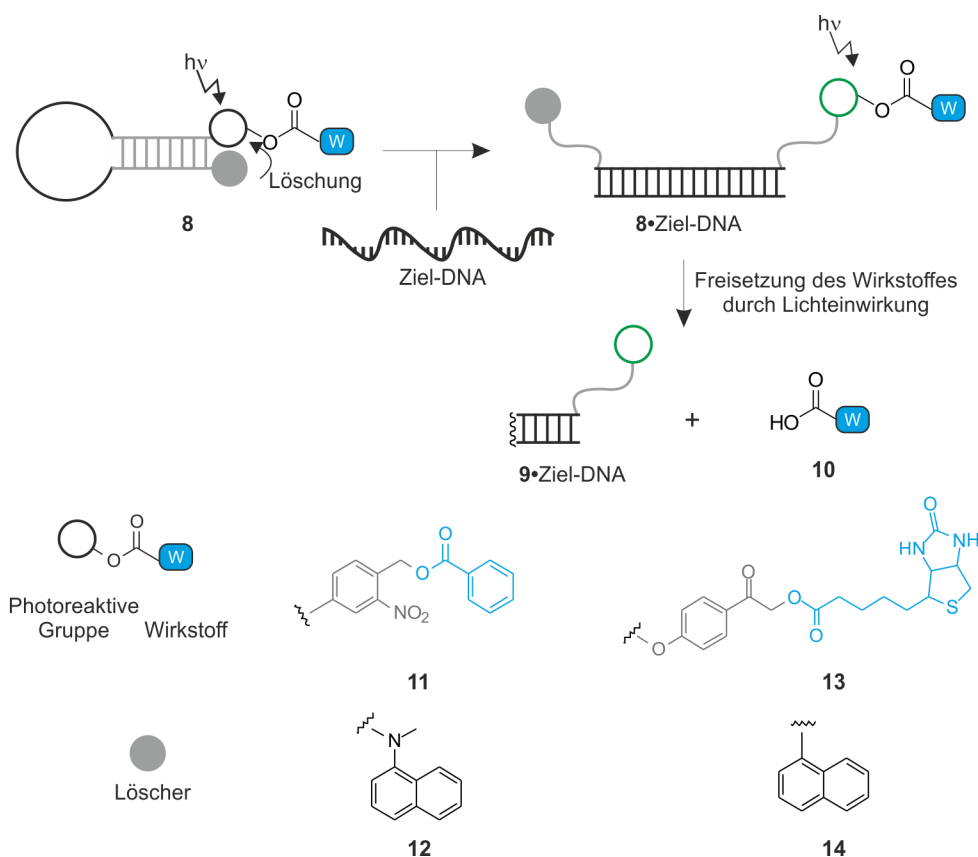


Abbildung 7: Photoaktivierte Wirkstofffreisetzung aus einem Oligonukleotid-Konjugat in Abhängigkeit von der Hybridisierung an eine Ziel-DNA.

Die Untersuchungen beschränkten sich bis jetzt auf *in vitro* Anwendungen, bei denen je ein Äquivalent einer synthetischen Ziel-DNA die Freisetzung eines kleinen Moleküls bewirkte. Damit würde sich eine Anwendung nur für Zielsequenzen anbieten, die in hohen Konzentrationen in der Zelle vorliegen. Weiterhin wurde zur Wirkstofffreisetzung Bestrahlung mittels UV-Licht genutzt, welches nicht gewebedurchgängig ist. Auch die Hydrolyseempfindlichkeit der verwendeten

Esterbindungen gegenüber endogenen Enzymen lässt eine *in vivo* Anwendung der gezeigten Systeme als ungeeignet erscheinen.

Gothelf *et al.* stellten basierend auf der photodynamischen Krebstherapie ein System vor bei dem die photoinduzierte Freisetzung von Singulett-Sauerstoff mit Hilfe von Nukleinsäurehybridisierung kontrolliert werden konnte.^[51] Bei der photodynamischen Therapie wird mit Hilfe eines Photosensibilisators und Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge im entsprechenden Gewebe Triplett-Sauerstoff in Singulett-Sauerstoff umgewandelt. Diese reaktive Sauerstoffspezies kann nekrotische bzw. apoptotische Prozesse auslösen. Die Gruppe um Gothelf verknüpfte den Photosensibilisator Pyropheophorbid-*a* **P** mit einer kurzen Nukleotidsequenz (**P**-DNA), während ein zweites dazu komplementäres Oligonukleotid mit einem Löscher **L** (*black hole quencher 3*) versehen wurde (**L**-DNA) (Abbildung 8). Bei Hybridisierung der beiden Oligonukleotidstränge wurden **P** und **L** so in räumlicher Nähe angeordnet, dass der Singulettzustand von **P** gelöscht wurde. Dadurch verringerte sich einerseits die Fluoreszenzintensität als auch die Wahrscheinlichkeit von **P** zum Übergang in den Triplett-Zustand. In Anwesenheit einer komplementären Zielsequenz (grün) kann diese spezifisch mit dem **L**-DNA-Strang hybridisieren und der **P**-DNA-Strang wird verdrängt. Bei Anregung von **P** kann dieser in den Triplettzustand übergehen und es wird toxischer Singulett-Sauerstoff erzeugt. In einer weiteren Arbeit konnte die Gruppe zeigen, dass endogene 28S rRNA als Zielsequenz dienen und die intrazelluläre Produktion von Singulett-Sauerstoff bewirken kann.^[52] Hierbei verwendeten sie 2'-OMe-RNA-Sequenzen, die stabiler gegenüber intrazellulären Nukleasen sind, sowie den effizienteren Photosensibilisator **InP** (Abbildung 8). Allerdings kann das Metallion In^{3+} in diesem Komplex leicht einen fünften Ligan den koordinieren. Da dieser auch durch Thiole aus endogenen Proteinen oder Aminosäuren bereitgestellt werden kann, könnten Nebenreaktionen intrazellulär sowohl den Katalysator als auch vorhandene Biomoleküle beeinflussen.

Mokhir *et al.* ersetzten daher In^{3+} durch Pd^{2+} oder Zn^{2+} -Ionen und konnten zusätzlich zeigen, dass Komplexe von Pyropheophorbid-*a* mit Zn^{2+} , Ni^{2+} , Pd^{2+} und InCl ebenfalls als Löschereinheit fungieren können.^[53] Die Verwendung von Metall-Pyropheophorbid-Komplexen sowohl als Löscher als auch Photosensibilisator verringerte die unerwünschte Photoaktivierung des **P**-DNA·**L**-DNA-Komplexes in Abwesenheit der Ziel-DNA.

Die Umwandlung von Triplett- in den toxischen Singulett-Sauerstoff erfolgte katalytisch, d. h. ein Molekül **MP**-DNA konnte sehr hohe Konzentrationen des Wirkstoffs erzeugen. Gothelf *et al.* stellten fest, dass ihr System keine Diskriminierung gegenüber Einzelbasenfehlpaarung zeigte und

die verwendeten 2'-OMe-RNA-Konjugate mit der Zeit abgebaut wurden, was zu einer unspezifischen Freisetzung von Singulett-Sauerstoff führte.^[52] Eine Verbesserung der Selektivität wurde erreicht, indem die Duplexstruktur durch eine Haarnadel-Struktur ersetzt wurde. Solche an die *Molecular Beacons* angelehnten Systeme zur hybridisierungskontrollierten Freisetzung von Singulett-Sauerstoff wurden auch von Chen *et al.* und Gao *et al.* vorgestellt.^[54,55] Erstere knüpften Pyropheophorbid als Photosensibilisator an das 5'-Ende und Carotenoid als Löscher an das 3'-Ende einer 2'-OMe-RNA-Sequenz. Die Gruppe berichtete, dass die Haarnadelstrukturen zellgängig waren. Die Bindung der Schleifenregion an c-raf-1 mRNA in MDA-MB-231 Zellen erlaubte die Photoaktivierung des Pyropheophorbids und die Produktion von Singulett-Sauerstoff, was zu einem erhöhten Zellsterben führte. Gao *et al.* nutzten die Eigenschaft von Porphyrin-basierten Photosensibilisatoren zur Selbstlöschung für eine ähnliche Anwendung aus.^[55]

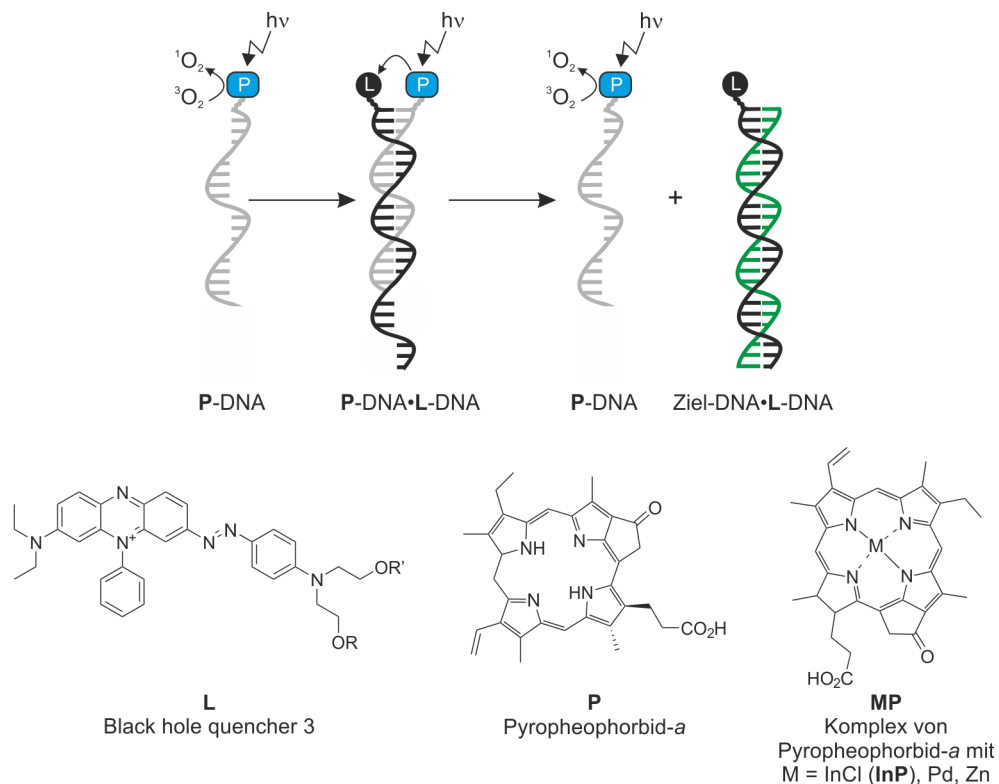


Abbildung 8: DNA-sequenzspezifische Kontrolle der Singulett-Sauerstoff Generierung.^[51–53]

Templatkatalysierte Freisetzung eines Wirkstoffes

Die Gruppe um Taylor stellte als erste ein Konzept für die Nukleinsäuretemplat-katalysierte Freisetzung eines Wirkstoffs vor (Abbildung 9).^[33] Dabei soll eine für die Infektion oder den Krebs spezifische mRNA- oder DNA-Sequenz als Templat dienen und gleichzeitig mehrere Reaktionen katalysieren. An diesem Templat werden die Vorstufe eines Wirkstoffes und ein Katalysator in

räumliche Nähe gebracht, wodurch der Katalysator einen zytotoxischen Wirkstoff freisetzen kann. Dabei ist der Katalysator an eine kurze Nukleotid-Sequenz in **15** gebunden, die an einen Abschnitt der komplementären Zielsequenz bindet. Das Oligonukleotid-Wirkstoff-Konjugat **16** hybridisiert benachbart dazu ebenfalls am Nukleinsäuretemplat. Auf diese Weise sind Katalysator und Wirkstoffvorstufe so angeordnet, dass eine chemische Reaktion erfolgen und der Wirkstoff freigesetzt werden kann. Da die wirkstofffreie Nukleinsäuresequenz **17** nach der Reaktion dieselbe Anzahl an Nukleotiden aufweist, wie die Eduktsequenz **16**, kann sie vom Templat-Katalysator-Komplex dissoziieren und ein neuer Reaktionszyklus eingeleitet werden. Damit wäre eine Anwendung auch bei geringen Konzentrationen eines zellendogenen RNA- oder DNA-Templats möglich. Die Grundlagenuntersuchungen von Taylor *et al.* basierten auf der Freisetzung eines *p*-Nitrophenols oder Coumarins **20** (Abbildung 9) aus ihren Estervorstufen mittels Hydrolyse.^[33,56,57] Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktionen selektiver gegenüber Einzelbasenfehlpaarungen verlaufen, wenn Wirkstoff und Katalysator an kurze PNA- statt DNA-Oligomere geknüpft sind. Die Freisetzung der Modellmoleküle folgte der Michaelis-Menten-Kinetik für enzymatisch katalysierte Reaktionen.

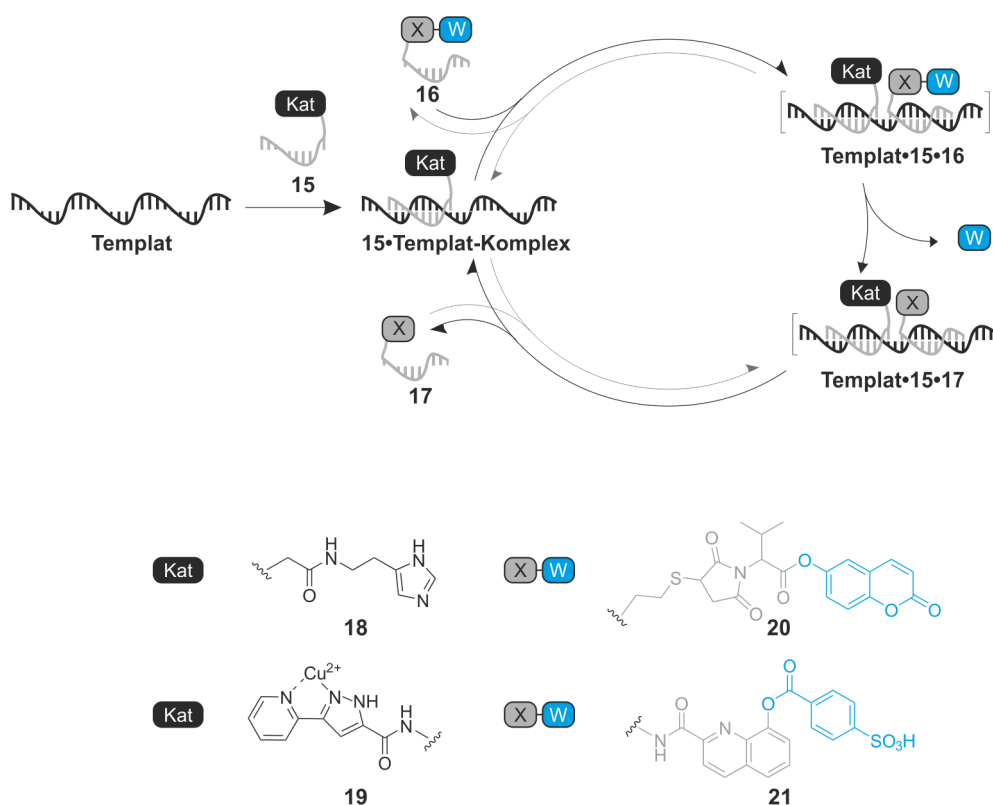


Abbildung 9: Konzept der templatkatalysierten Freisetzung eines Wirkstoffs. Mit einem Wirkstoff bzw. Katalysator verknüpfte PNA-Oligomere hybridisieren benachbart an einem Nukleinsäuretemplat, wodurch der Katalysator den Wirkstoff freisetzen kann. Dissoziation und Strangaustausch ermöglichen eine katalytische Reaktionsführung.^[33,58]

Krämer *et al.* haben einen ähnlichen Ansatz zur DNA-Detektion verfolgt.^[58–60] In diesem Fall wirkte ein Cu^{II}-Komplex **19** als Katalysator für die Esterhydrolyse. Mit diesem System konnte ebenfalls ein katalytischer Umsatz der Reaktanden gezeigt werden. Einzelbasenfehlpaarungen im Templat verringerten die Reaktionsgeschwindigkeit. Allerdings wurde sowohl bei Taylor *et al.* als auch bei Krämer *et al.* eine starke Hintergrundreaktion in Abwesenheit des Templats beobachtet. Darüber hinaus können Esterbindungen in biologischen Systemen durch Esterasen gebrochen werden, womit die Wirkstofffreisetzung unspezifisch erfolgen würde.

Die bisher beschriebenen Ansätze zur nukleinsäuregesteuerten Freisetzung von Wirkstoffen aus ihren Vorstufen beruhten auf Strangaustauschprozessen oder Esterspaltungsreaktionen. Damit sind die Systeme nur begrenzt mit biologischen Systemen kombinierbar und empfindlich gegenüber dem Abbau durch Nukleasen oder Esterasen. Im Kontext der Nukleinsäuredetektion wurden templatkatalysierte Reaktionssysteme vorgestellt, die den Nachweis von zellulärer RNA in lebenden Zellen erlaubten und prinzipiell auf die templatgesteuerte Freisetzung von Wirkstoffen übertragbar wären.^[19] Die Gruppe um Kool *et al.* untersuchte zunächst zellkompatible, templatkatalysierte Selbstligationsreaktionen.^[17,61–63] Die *quenched autoligation probes* (QUAL, gelöschte Autoligationssonden)^[61,64,65] basieren auf der Verdrängung eines Fluoreszenzlöschers mittels nukleophiler Substitution. Bei benachbarter Hybridisierung an einer Zielsequenz erfolgt eine Verknüpfung der beiden Sonden, wobei der Fluoreszenzlöcher freigesetzt wird und ein Ansteigen der Fluoreszenz die Anwesenheit der Zielsequenz signalisiert. Es ist prinzipiell denkbar, dass die Löcher-Einheit durch ein Wirkstoffmolekül ersetzt werden könnte. Interessanterweise wurden die QUAL-Sonden bereits zur Detektion von RNA in lebenden Zellen verwendet, womit eine intrazelluläre Wirkstofffreisetzung basierend auf dieser Chemie prinzipiell möglich wäre. Allerdings wurden eine langsame Ligationsgeschwindigkeit sowie mögliche Nebenreaktionen mit endogenen Nukleophilen als Einschränkungen aufgezeigt. Durch die Verknüpfung der DNA-Fragmente am DNA-Templat erhöht sich die Anzahl der kooperativen Watson-Crick-Basenpaarungen und damit die Affinität des Produktes zum Templat, wodurch die katalytische Aktivität des Templats inhibiert wird. Es wurde versucht, diesem Problem durch strukturelle Änderungen im Ligationsprodukt zu entgegen, allerdings wurde nur eine vergleichsweise geringe katalytische Aktivität des Templats erhalten.^[65] Mit einem neueren Ansatz konnte die Gruppe schnellere Reaktionsgeschwindigkeiten erhalten und die Biostabilität der Konjugate erhöhen. Es wurde eine templatkatalysierte Staudingerreaktion zur Freisetzung eines Fluoreszenzlöschers und Anschalten eines Fluoreszenzsignals vorgestellt, wobei sich die Sequenzlänge der Sonden, wie bereits bei Taylor *et al.* oder Krämer *et*

al. gezeigt, nicht änderte.^[66] Dieses System ermöglichte eine verbesserte Signalamplifikation und die selektive Detektion von Nukleinsäuren sowohl *in vitro* als auch direkt in Prokaryotenzellen.

Kürzlich stellten Winssinger *et al.* ein ähnliches System zur templatkatalysierten Freisetzung von funktionalen Molekülen vor (Abbildung 10).^[67] Die Freisetzung erfolgt aus einem *p*-Azidobenzyl-derivat **23**, welches sich in Gegenwart eines Phosphins basierend auf der Staudingerreaktion zersetzt. An die benzyliche Position von *p*-Azidobenzol wurden als Modellwirkstoffe ein Fluorophor (Rhodamin) **26** und Estradiol **27** in Form von Carbamaten oder Carbonaten gebunden und auf diese Weise maskiert. Die Wirkstoffderivate sowie Triscarboxyethylphosphin (TCEP) wurden an kurze PNA-Sequenzen geknüpft. In Anwesenheit eines kurzen synthetischen RNA-Templats hybridisieren die Phosphin-markierte PNA **22** und die Azid-PNA **23** benachbart am Templat.

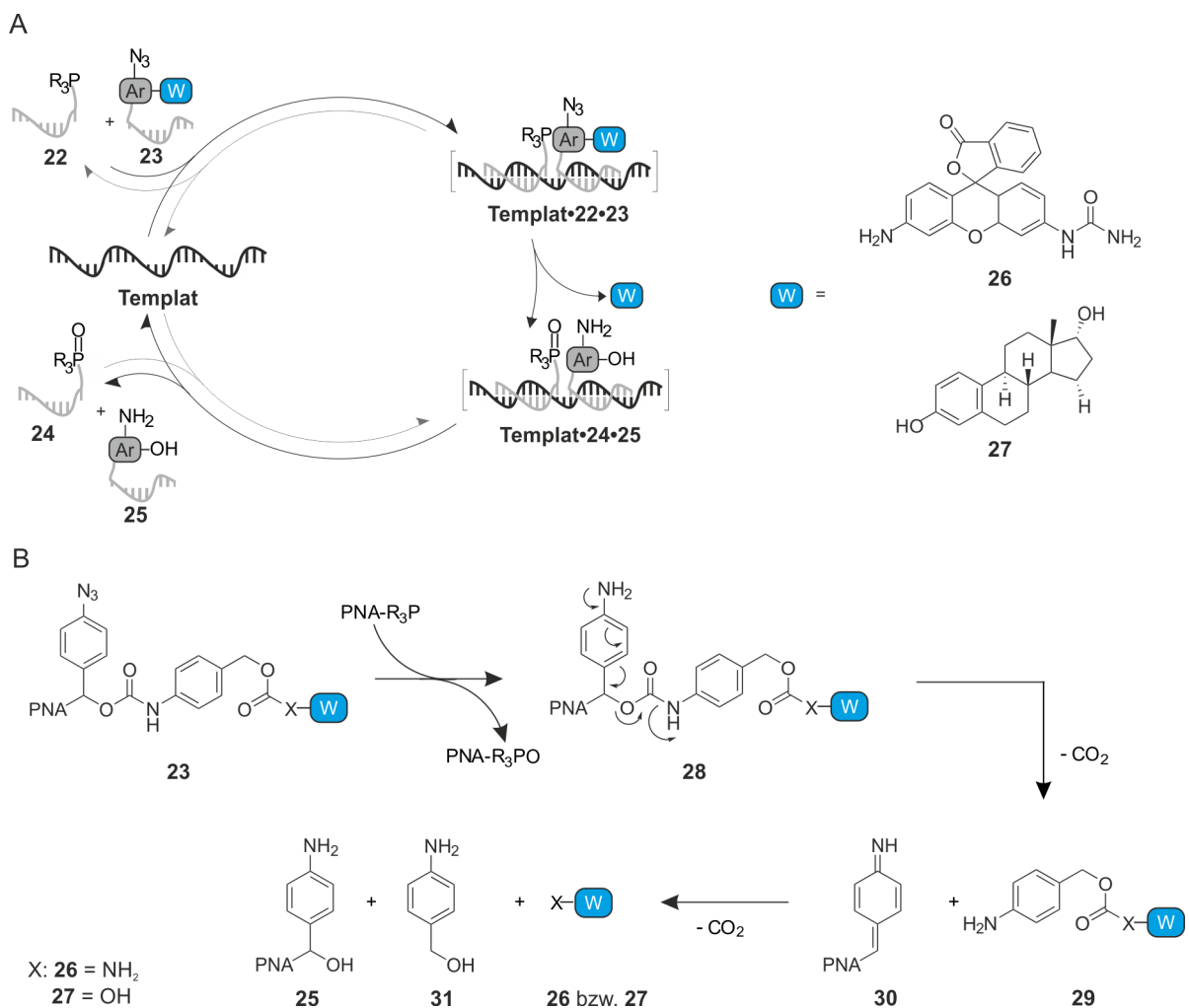


Abbildung 10: A) Konzept der DNA-Templat-katalysierten Azid-aktivierten Freisetzung von funktionalen Molekülen. B) Reaktionsschema für die Molekülfreisetzung nach Azid-Reduktion.^[67]

Dies ermöglicht die Reduktion des Azids und das entstehende Amin **29** zerfällt, wobei die Wirkstoffmoleküle **26** oder **27** aus dem Derivat freigesetzt werden (Abbildung 10B). In Anwesenheit einer Zufallssequenz oder zwei Einzelbasenfehlpaarungen im Templat lief die Reaktion kaum ab. Weiterhin war keine unerwünschte Freisetzung in Abwesenheit des Templats zu beobachten. Hingegen konnte ein geringer katalytischer Umsatz in Gegenwart des komplementären Templats beobachtet werden. Die Gruppe modifizierte die PNA-Konjugate auch dahingehend, dass eine intrazelluläre Anwendung möglich scheint. Allerdings konnten die bisherigen Experimente nur in Puffer durchgeführt werden. Bei dem Zerfall des Azid-Derivates entsteht als zusätzliches Nebenprodukt der Aminobenzylalkohol **31**.

2.1.4 Nukleinsäuregesteuerter Aufbau von Wirkstoffen

Alle bisher vorgestellten Systeme beruhten auf der nukleinsäuregesteuerten Freisetzung von Modellwirkstoffen. Vor allem mit dem zuletzt vorgestellten Ansatz wurde ein Reaktionsmechanismus aufgezeigt, um die unspezifische Freisetzung in Abwesenheit des Nukleinsäuretemplats zu vermindern. Bisher wurde allerdings nur die *in vitro* Anwendung dieses Systems gezeigt. Die Spezifität der Reaktionen könnte auch durch den Aufbau von Wirkstoffmolekülen durch eine nukleinsäurevermittelte Knüpfung von kovalenten Bindungen erhöht werden. Dabei müssten die Wirkstoffe templatkatalysiert, selektiv und sensitiv aus inaktiven Fragmenten aufgebaut werden.

Templatkatalysierte Reaktionen, die zu einer Bindungsknüpfung führten, wurden z. B. von Grossmann *et al.* zum Nachweis von DNA und RNA genutzt.^[68,69] Sie konnten mit einem DNA-katalysierten Transfer von fluoreszierenden Reportergruppen hoch sensitiv und selektiv einzelbasenfehlgepaarte DNA nachweisen und vom Wildtyp unterscheiden. Dafür wurden eine Donor-PNA-Sonde **32** und eine Akzeptor-PNA-Sonde **33** verwendet, die benachbart an einem komplementären DNA-Templat hybridisieren (Abbildung 11). Die Donor-Sonde trägt eine Reportergruppe (grau), die kovalent als Thioester an das PNA-Peptid-Konjugat **32** gebunden ist, während die Akzeptor-Sonde **33** N-terminal einen *Iso*-Cystein-Rest trägt. Die Hybridisierung der beiden Sonden am Templat ermöglicht einen Thioesteraustausch, wodurch **36** gebildet wird. Es folgt ein irreversibler S→N-Acyltransfer und nach erfolgter Dissoziation vom Templat wird **34** erhalten. Demnach wurde die Reportergruppe unter Ausbildung einer neuen Amidbindung auf eine zweite PNA-Sonde übertragen. Der Transfer einer solchen Reportergruppe lässt sich, wie Grossmann *et al.* zeigen konnten, unter katalytischen Bedingungen durchführen.^[68–70] Damit können sehr geringe Mengen der Zielsequenz detektiert werden. Die Kopplung der Transferreaktion mit einem modifizierten ELISA ermöglichte den Nachweis von 500 attomol einer RNA-Zielsequenz.^[68]

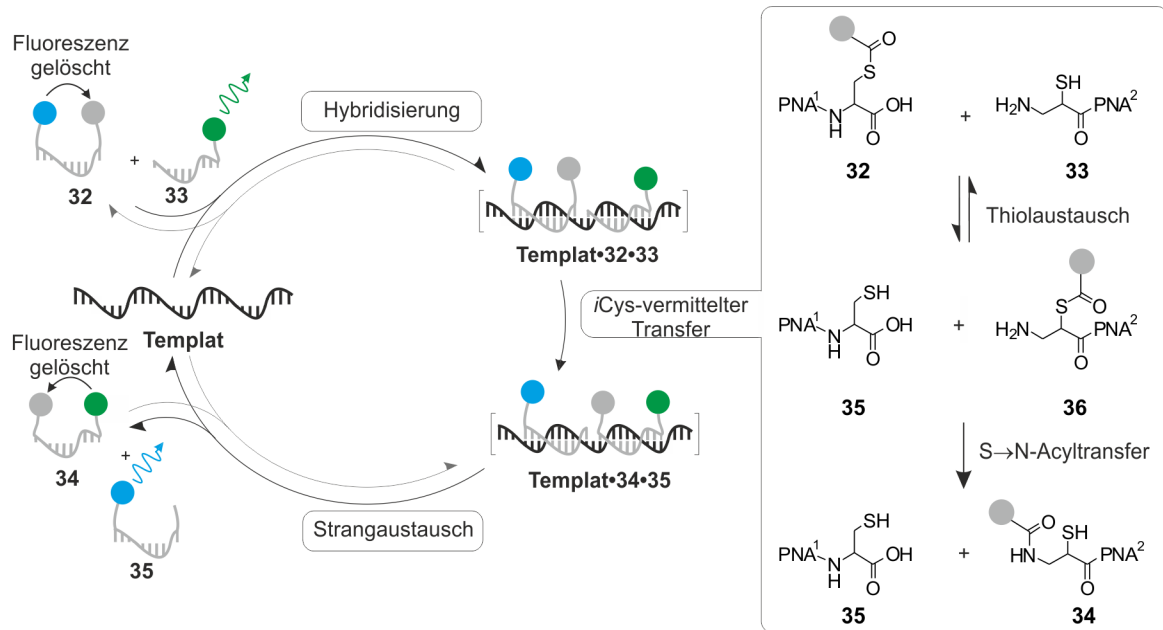


Abbildung 11: Konzept des templatkatalysierten Transfers einer Reportergruppe. Im Kasten rechts ist das Reaktionsschema der *iCys*-vermittelten Transferreaktion abgebildet.

Der Transfer einer Reportergruppe zum Nukleinsäurenachweis folgt dem Mechanismus der *native chemical ligation* (native chemische Ligation, NCL), der beim Aufbau von längeren Peptiden aus ungeschützten Peptidfragmenten genutzt wird.^[71] Bereits 1996 nutzte die Gruppe um Joyce diese Verknüpfungsstrategie für die templatkontrollierte spezifische Verknüpfung von Oligonukleotiden und Peptiden unter Verwendung von Thiol- und Amino-modifizierten DNA-Oligomeren und Peptidthioestern.^[9] Dabei wurde zunächst aus einem aktivierten Peptid-Thioester **37** und einer 5'-Thiol-modifizierten DNA-Sequenz **38** ein Peptid-DNA-Intermediat mit einer Thioesterbindung wie in **39** erzeugt. Anschließend wurde dieses Intermediat durch Hybridisierung an einem DNA-Templatstrang in direkte Nachbarschaft zu einem 3'-Amino-modifizierten Oligonukleotid **40** gebracht. Der Angriff der Aminofunktion am reaktiven Carbonylkohlenstoff führte zur Knüpfung einer Amidbindung im neu entstandenen DNA-Peptid-Konjugat **41** und die Thiol-DNA **38** sowie das Templat wurden zurückgewonnen. Die Verwendung eines DNA-Templats erlaubte die simultane Verknüpfung von DNA- und Peptidsequenzen in Anwesenheit verschiedener Eduktkonjugate in einer sequenzspezifischen Weise.

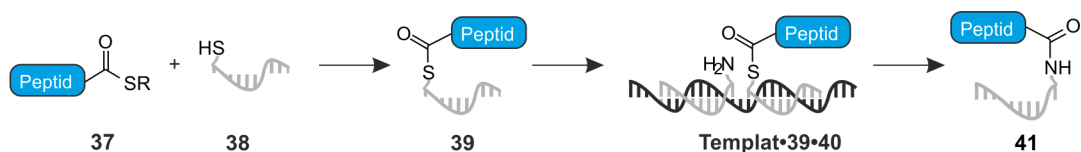


Abbildung 12: Templatkontrollierte Verknüpfung von Peptiden und Oligonukleotiden.^[9]

In beiden beschriebenen Acyltransferreaktionen wurden aktive Moleküle unter Knüpfung von kovalenten Bindungen übertragen, aber keine neuen Einheiten aufgebaut. Liu *et al.* untersuchten den DNA-Templat-gesteuerten Acyltransfer zum Aufbau von Tripeptiden aus Aminosäure-DNA-Konjugaten (**42** - **44** in Abbildung 13).^[72] In diesen waren die Aminosäuren als *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Aktivester gebunden. Durch aufeinanderfolgende Hybridisierung am DNA-Templat und Verwendung von Blocker-Sequenzen (**BS1** und **BS2** in Abbildung 13) wurden diese so angeordnet, dass Tripeptide wie in **46** in drei sukzessiven Acyltransferreaktionen geordnet aufgebaut wurden. Kürzlich verwendeten McKee *et al.* Oligonukleotid-Thioester-Konjugate als Aktivester und untersuchten die Reaktivität von verschiedenen Nukleophilen für den DNA-Templat-gesteuerten Acyltransfer.^[73] Dabei wurde ein Farbstoffmolekül unter Ausbildung einer Amidbindung auf ein Nukleophil übertragen und ein neues Molekül aufgebaut.

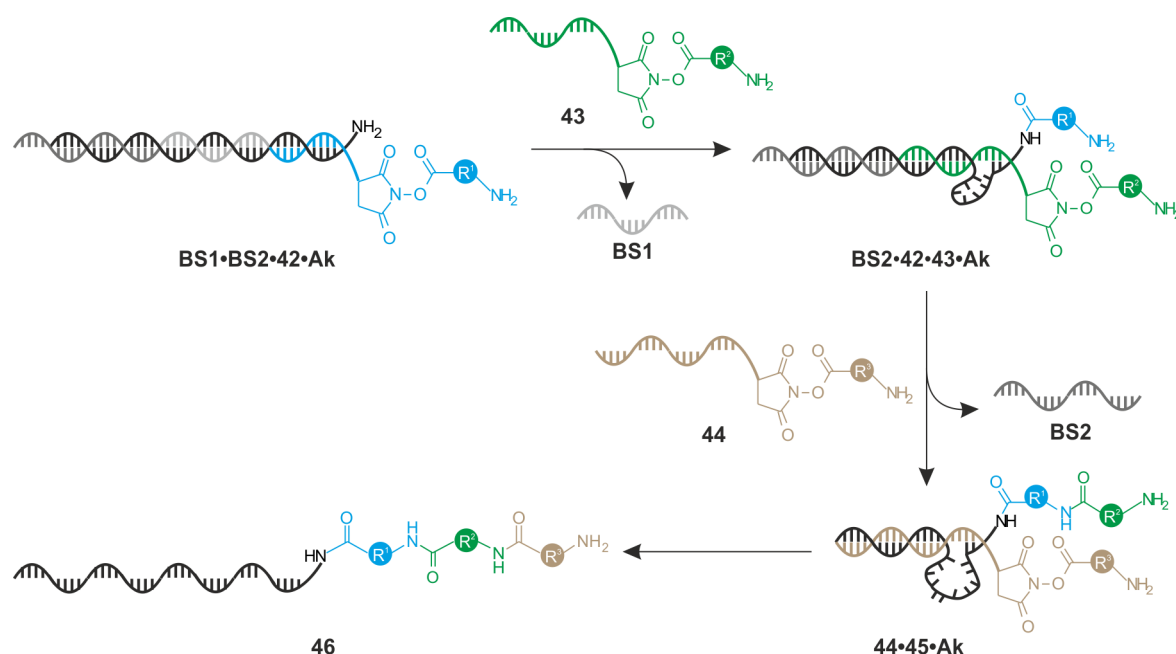


Abbildung 13: Templatkontrollierte Synthese von Tripeptiden (BS = Blockersequenz, Ak = Akzeptor-DNA).

Die beschriebenen Untersuchungen zum templatkontrollierten Acyltransfer zeigen, dass mit Hilfe von Nukleinsäuretemplaten Reaktionen unter Bindungsknüpfung gesteuert und neue funktionelle Einheiten aufgebaut werden können. Bei den beschriebenen templatvermittelten Acyltransferreaktionen von Bruick *et al.*, Liu *et al.* und McKee *et al.* diente das Templat als Gerüst an dem die Reaktanden in einer günstigen Anordnung positioniert wurden. Im Gegensatz dazu zeigten Ziel-DNA und -RNA im System von Grossmann *et al.* auch katalytische Aktivität. Für den nukleinsäuregesteuerten Aufbau von Wirkstoffmolekülen ist eine katalytische Wirksamkeit des Temp-

lats nötig, damit die Bildung der Wirkstoffe auch in Anwesenheit von sehr geringen Mengen des Templat und damit in einem biologisch relevanten Kontext z. B. zellintern erfolgen könnte.

Während meiner Diplomarbeit wurde ein Ansatz verfolgt, nachdem die sequenzspezifische Hybridisierung zweier PNA-Oligomere zur Bildung eines bioaktiven Peptids führt.^[74–76] Nach diesem Konzept trägt ein Oligomer ein Peptid, welches C-terminal als Thioester in **47** gebunden ist. An das zweite PNA-Oligomer ist ein Peptid mit N-terminalem Cysteinrest (**48**) geknüpft. Die beiden Konjugate können benachbart an einem komplementären DNA-Templat hybridisieren, wodurch die funktionellen Gruppen so angeordnet werden, dass ein Thiolaustausch erfolgen kann. Mittels einer Cystein-vermittelten Transferreaktion wird ein Peptid auf das Zweite übertragen, wobei der intermediär entstehende Thioester **49** über einen irreversiblen S→N-Acyltransfer umlagert und eine natürliche Peptidbindung in **51** ausgebildet wird. Es entsteht ein Peptid-PNA-Konjugat **51** und ein freies PNA-Oligomer **50** (Abbildung 14).

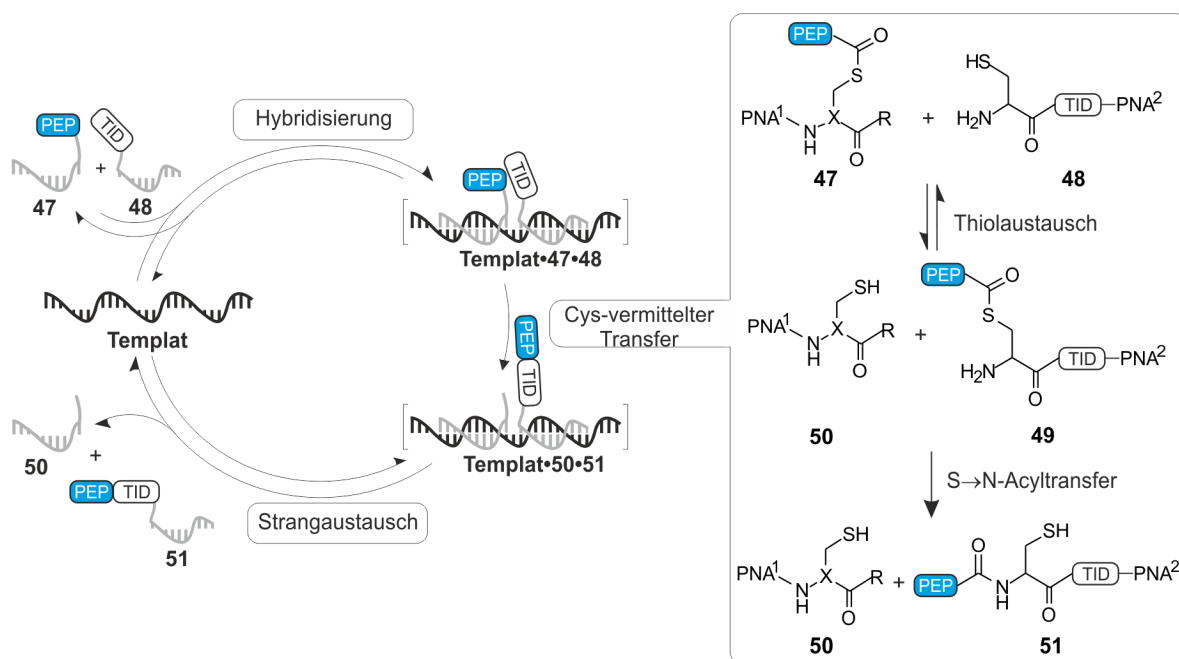


Abbildung 14: Templatkatalysierter Peptidtransfer zum Aufbau von bioaktiven Peptiden. X = CH(CH₂)₄NHCOCH₂

Die Reaktionsprodukte **50** und **51** weisen dieselbe Zahl an Nukleotiden auf wie die Ausgangsverbindungen **47** und **48**. Daher kann die Reaktion unter Bedingungen eines dynamischen Strangaustauschs ablaufen und das Templat erlangt katalytische Wirksamkeit.^[76] Mit dem vorliegenden Ansatz werden Peptid-PNA-Chimären verwendet, in denen die PNA als Erkennungssequenz dient und die angehängten Peptide eine biologische Wirksamkeit erlangen. In der Entwicklung von Wirkstoffen bilden Peptide interessante Leitstrukturen, denn die Regulation vieler

biologischer Prozesse beruht auf Protein-Protein- oder Peptid-Protein-Wechselwirkungen. Insbesondere die Produkte von Onkogenen üben ihre Funktion durch diese nicht-kovalenten Wechselwirkungen aus. Im Gegensatz zu Enzymen können diese nur schwer durch kleine Molekülinhibitoren adressiert werden.^[77,78] Konjugate von Peptiden und PNA wurden bisher allerdings vor allem dazu generiert, um die Eigenschaften der PNA-Sequenz zu modifizieren. Im Folgenden wird kurz auf die Eigenschaften, Synthese und Verwendung von PNA und PNA-Peptid-Konjugaten eingegangen.

2.2 PNA und PNA-Peptid-Konjugate

PNA ist ein DNA-Analogon, in dem das Zuckerphosphatrückgrat der DNA durch achirale *N*-(2-Aminoethyl)glycin-Einheiten ersetzt ist und die Nukleobasen über eine Carboxymethyl-Einheit angebunden sind (Abbildung 15B und C).^[79] Die Monomereinheiten im PNA-Einzelstrang sind wie in Proteinen und Peptiden über Amidbindungen verknüpft (Abbildung 15A und B). Trotz des großen strukturellen Unterschieds bindet PNA komplementäre DNA oder RNA mit sehr hoher Affinität. Die Komplexe von PNA mit DNA oder RNA sind sogar stabiler als die entsprechenden DNA·DNA- oder DNA·RNA-Komplexe. Dies wird im Wesentlichen durch das ungeladene Rückgrat ermöglicht, wodurch eine Coulomb-Abstoßung mit dem geladenen Zuckerphosphatrückgrat der DNA oder RNA vermieden wird. Die Hybridisierung verläuft dabei bevorzugt aber nicht ausschließlich antiparallel, d. h. der *N*-Terminus der PNA bindet an das 3'-Ende der komplementären DNA oder RNA. Außerdem erfolgt die Hybridisierung sequenzspezifischer. So führt eine Einzelbasenfehlpaarung zu einer stärkeren Destabilisierung von PNA·DNA-Duplexen als in DNA·DNA-Analoga.^[80]

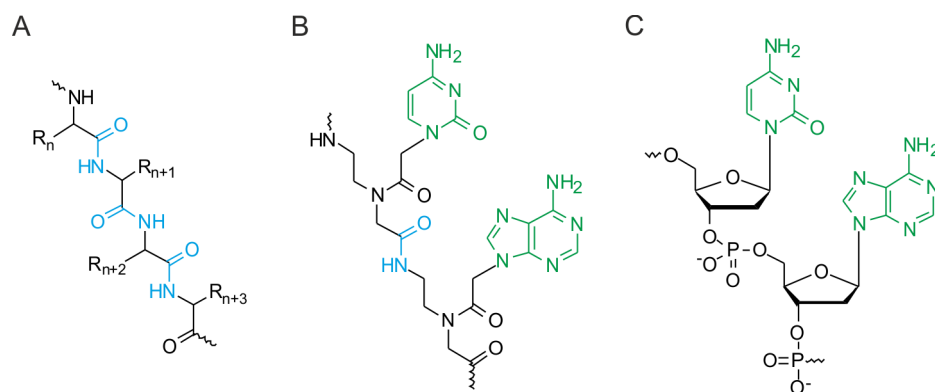


Abbildung 15: Vergleich der chemischen Strukturen von A) Peptiden, B) PNA und C) DNA.

PNA ist chemisch sehr resistent und sowohl gegenüber Säuren als auch Basen stabil. Sie zeichnet sich auch durch eine hohe biologische Stabilität aus. So wird sie in Zellen weder durch Nukleasen

noch Proteasen abgebaut und ist damit eine interessante Struktur für intrazelluläre Anwendungen wie antisense oder antigene-Ansätze^[81,82] oder der Detektion von intrazellulären Nukleinsäuren.

Die größte Herausforderung für die Anwendung von PNA für therapeutische Zwecke ist die geringe Bioverfügbarkeit der Moleküle. Da die Zellgängigkeit des Oligomers allein gering ist, wurde die Aufnahme von PNA in Zellen durch unterschiedliche Methoden erreicht. Dazu gehören die Mikroinjektion, Elektroporation oder die Membranpermeabilisierung durch Streptolysin O.^[83–85] Corey *et al.* zeigten die Aufnahme von PNA in Prostatatumorzellen durch PNA-DNA-Kotransfektion.^[86] In Bezug auf die Aktivität der transfizierten PNA in der Zelle, scheint die Konjugation mit zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) am effektivsten zu sein. Allerdings werden hohe Konzentrationen der Konjugate benötigt, da sie in Endosomen aufgenommen werden und damit blockiert sind.^[87] Ein weiterer Nachteil von PNA-Oligomeren ist deren geringe Löslichkeit in wässriger Umgebung und Tendenz zur Selbstaggregation aufgrund ihrer Ladungsneutralität.^[85,88,89] Der Einbau von geladenen Lysin-Resten in Form von C- oder N-terminalen Modifikationen oder durch Ersatz des Glycinrückgrats kann die Löslichkeit von PNA-Sequenzen erhöhen.

Konjugate von PNA- und Peptidsequenzen können linear nach Protokollen der Festphasenpeptidsynthese und mit aus der Peptidsynthese bekannten Bausteinen aufgebaut werden. Für die Synthese von längeren Konjugaten können gleichfalls Methoden der Fragmentkondensation angewandt werden.^[90] Für die lineare Festphasensynthese von Peptid-PNA-Hybriden werden zwei Methoden basierend auf der Boc- bzw. Fmoc-Strategie genutzt. Die einzelnen PNA-Monomere oder Aminosäuren werden schrittweise aneinandergeknüpft, wobei ein Reaktionszyklus jeweils aus der Abspaltung der temporären Schutzgruppe, der Amidbindungsknüpfung und der Acetylierung von nicht umgesetzten Sequenzen besteht (Abbildung 16). Bei der Boc-Synthese wird zunächst die temporäre Boc-Schutzgruppe der N-terminalen Aminofunktion durch Behandlung mit TFA abgespalten, während die exozyklischen Aminogruppen von Adenin, Cytosin oder Guanin mit der Cbz-Schutzgruppe blockiert sind.^[91] Alternativ wird die basenlabile Fmoc-Gruppe für die temporäre Schützung und die Bhoc-Gruppe zur permanenten Blockierung der exozyklischen Aminofunktionen eingesetzt.^[92] Die Synthese erfolgt an funktionalisierten Polymerharzen wie sie aus der Festphasenpeptidchemie bekannt sind. Zunächst wird der polymere Träger mit einem Monomer beladen, wobei es sich meist um eine Aminosäure wie Glycin oder Lysin handelt. Dabei werden Kupplungsreagenzien wie HATU (2-(7-Aza-1H-benzotriazo-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat), HCTU (2-(6-Chloro-1H-benzotriazo-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-

aminiumhexafluorophosphat) oder PyBOP ((Benzotriazo-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat) in Gegenwart milder Basen wie NMM oder DIPEA eingesetzt.

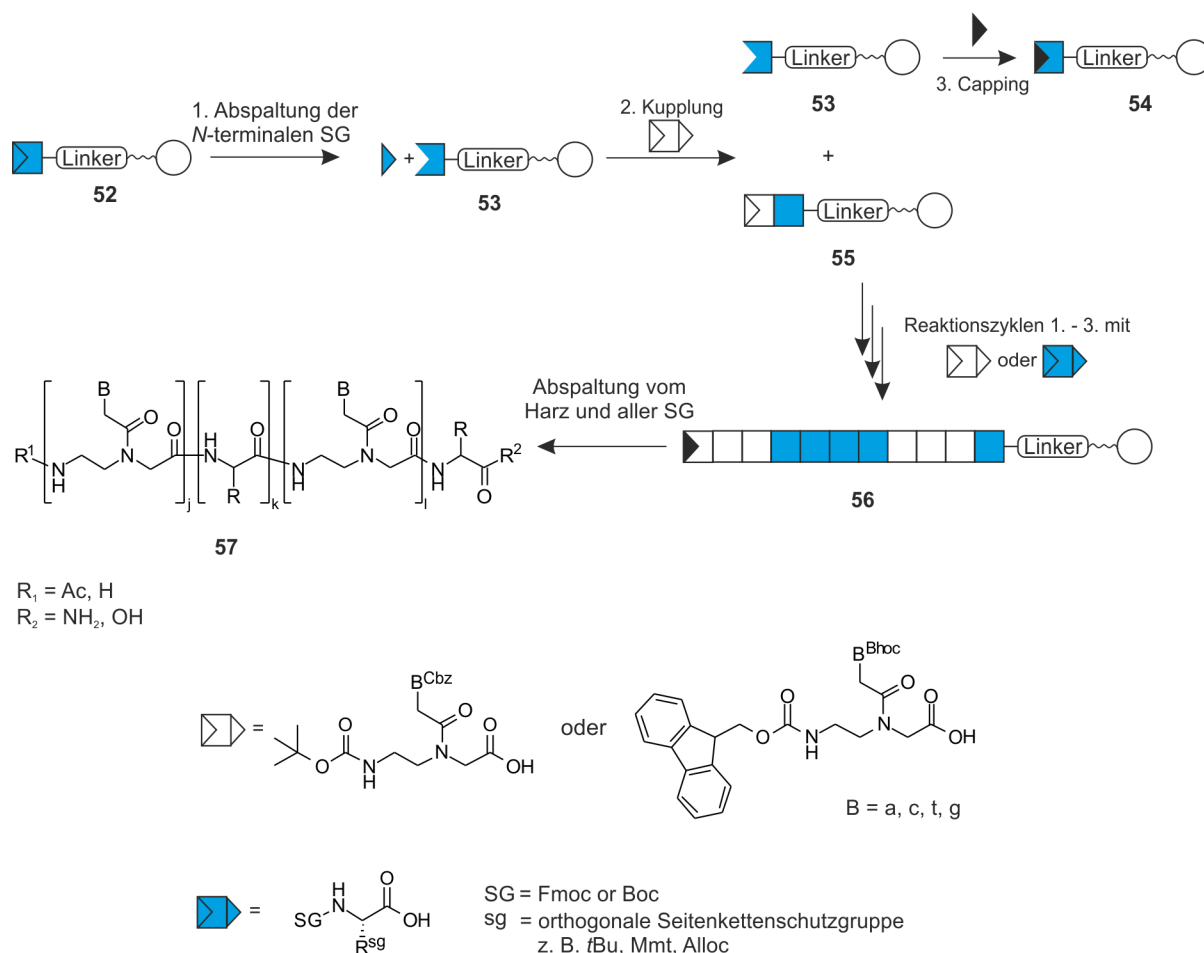


Abbildung 16: Generelles Syntheschema zur Festphasensynthese von Peptid-PNA-Konjugaten sowie Strukturen der geschützten Boc/Cbz- und Fmoc/Bhoc-Monomere.

Nach der Kupplung werden freie Aminofunktionen durch Acetylierung mit einer Mischung von Pyridin oder 2,6-Lutidin und Essigsäureanhydrid blockiert, um Deletionssequenzen zu vermeiden. Die finale Abspaltung vom Harz erfolgt in Gegenwart von Säuren wie TFA oder TFMSA. Die Synthese von Peptid-PNA-Konjugaten nach Protokollen der Festphasenpeptidsynthese ermöglicht auch eine relativ einfache Modifizierung der Konjugate. So wurden PNA- oder Peptid-PNA-Sequenzen z. B. mit Fluoreszenzfarbstoffen oder funktionalen Molekülen wie Biotin markiert.^[68,69,93,94] Kummer *et al.* nutzten PEG-modifizierte fluorogene PNA-Sonden für den Nachweis von viraler mRNA in infizierten Zellen.^[95]

2.3 Smac – ein Peptid in der Krebstherapie

Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache in der westlichen Welt und trotz verschiedenster, meist aggressiver Therapien sind viele Tumore resistent gegenüber den etablierten Behandlungsmethoden. Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass Krebszellen die Fähigkeit zum programmierten Zelltod, der Apoptose, verlieren.^[96,97] Um die Tumorresistenz zu vermeiden, richten sich Anstrengungen zur Entwicklung von neuen Krebstherapien daher auf apoptotische Signalwege.^[98–100] Im Jahr 2000 wurde das proapoptotische Protein Smac (*second mitochondria-derived activator of caspase*) entdeckt^[101,102] und es wurde sehr bald gezeigt, dass von Smac abgeleitete Peptide oder Peptidmimetika Krebszellen dafür sensibilisieren können, den programmierten Zelltod einzuleiten.^[97,103–110]

2.3.1 Apoptose

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und der Homeostase von vielzelligen Organismen.^[111–114] Fehlfunktionen der apoptotischen Prozesse können zu Immunschwäche- oder neurodegenerativen Krankheiten sowie Krebs führen.^[98,115] So wird z. B. in vielen Krebszellen der Zelltod verhindert, indem antiapoptotische Proteine überexprimiert werden.

Apoptose wird über zwei Signalwege eingeleitet (Abbildung 17). Der extrinsische Weg wird über Todesrezeptoren vermittelt und führt zur Aktivierung der Initiatorcaspase-8, welche wiederum weitere sogenannte Effektorcaspasen bindet und proteolytisch aktiviert. Caspasen gehören zu einer Gruppe von Cystein-Proteasen, die ihre Substrate C-terminal von Aspartat schneiden. Sie liegen in der Zelle als inaktive Procaspasen vor und werden durch Proteolyse und Dimerisierung aktiviert. Dabei unterscheidet man Initiatorcaspasen, wie die Caspase-8, die sich nach proapoptotischen Signalen autoaktivieren und Effektorcaspasen, die von den Initiatorcaspasen aktiviert werden und anschließend eine Vielzahl an zellulären Substraten schneiden. Dies führt letztendlich zum Zelltod. Der intrinsische Signalweg der Apoptose wird durch Schäden an der DNA z. B. aufgrund von Strahlung oder Chemotherapeutika ausgelöst. Dies führt zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und der Freisetzung von Cytochrom C. Dieses bindet im Cytosol, zusammen mit ATP, an Apaf-1 und bildet damit das Apoptosom. Der Proteinkomplex prozessiert die Procaspase-9 zur aktiven Initiatorcaspase-9, welche wiederum die Effektorcaspasen-3 und -7 aktiviert.

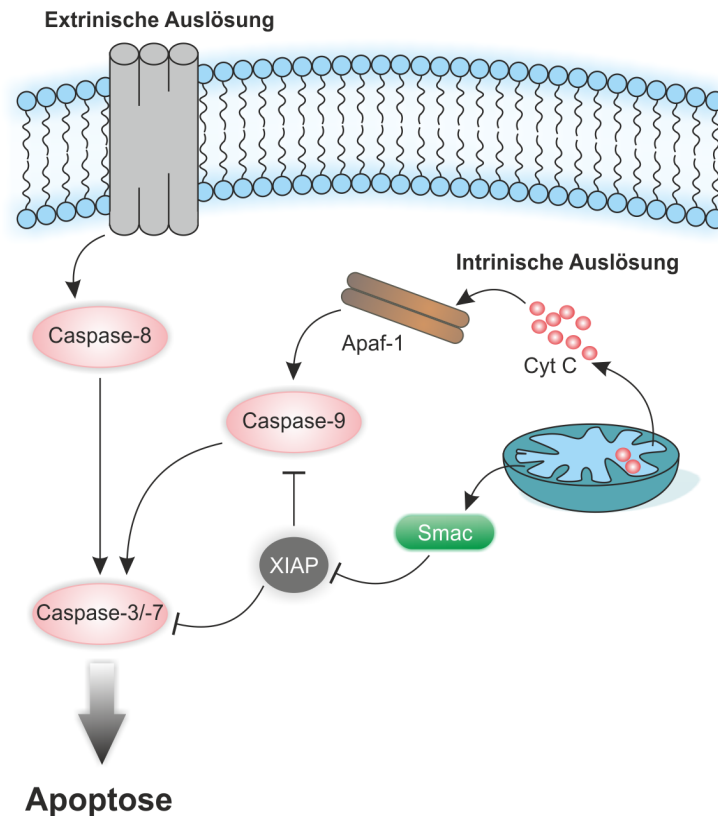


Abbildung 17: Signalwege der Apoptose (Ausschnitt).

Die Aktivierung der Caspasen stellt einen kritischen Punkt dar, nach dessen Überschreiten die Apoptose nicht mehr aufzuhalten ist. Daher gibt es antiapoptotische Regulatorproteine, welche die Caspasen inhibieren und ein zufälliges Auslösen der Apoptose verhindern können. Dazu gehören die *Inhibitor of Apoptosis Proteins* (IAPs), die die Autoaktivierung der Initiatorcaspasen verhindern und verschiedene Effektorcaspasen inhibieren.^[116] Die Anwesenheit von ein bis drei *baculoviral LAP repeat* (BIR)-Domänen ist charakteristisch für diese Proteinfamilie. Das humane *X-linked LAP* (XIAP) ist das am besten charakterisierte Protein der IAPs und auch das einzige, das die Caspasen durch direkte Bindung inhibiert, während andere IAPs indirekt wirken. Allerdings wird XIAP in einigen Krebszelllinien überexprimiert^[117,118] und bewirkt eine Resistenz von Krebszellen gegenüber verschiedenen Krebstherapien.^[119–121] XIAP bindet und inhibiert die Effektorcaspasen-3 und -7 und die Initiatorcaspase-9. Nach einem proapoptotischen Stimulus muss die inhibierende Wirkung von XIAP aufgehoben werden, damit die Apoptose ablaufen kann. Dies wird durch das mitochondriale Protein Smac erreicht. Es konkurriert mit den Caspasen um die Bindung an XIAP und verdrängt diese damit aus dem Komplex. Die Caspasen werden aktiviert.

2.3.2 Smac wirkt als XIAP-Antagonist

XIAP inhibiert Caspase-9 und die Caspasen-3 und -7 über zwei unterschiedliche Mechanismen. Die BIR2-Domäne deaktiviert, zusammen mit zusätzlichen Resten außerhalb der Domäne, die Caspasen-3 und -7, während die BIR3-Domäne spezifisch die proteolytisch aktivierte Caspase-9 inhibiert.^[122–127] Bei der Prozessierung der Procaspase-9 wird am N-Terminus der kleinen p12-Untereinheit das 4mer-Bindungsmotif ATPF freigesetzt.^[124] Die BIR3-Domäne bindet dort an die Caspase-9 und verhindert dadurch den Zugang der Caspasesubstrate zum aktiven Zentrum (Abbildung 18). Shiozaki *et al.* zeigten außerdem, dass dadurch die Dimerisierung der Caspase verhindert wird und die monomeren Proteine keine Aktivität aufweisen.^[123] Smac wird nach einem proapoptotischen Stimulus aus dem Mitochondrium freigesetzt und verdrängt die Caspase-9 von der BIR3-Domäne von XIAP. Strukturanalysen zeigten, dass diese Bindung der Wechselwirkung mit dem ATPF-Motiv der Caspase-9 sehr ähnlich ist und über die vier N-terminalen Aminosäuren AVPI von Smac vermittelt wird.^[128,129]

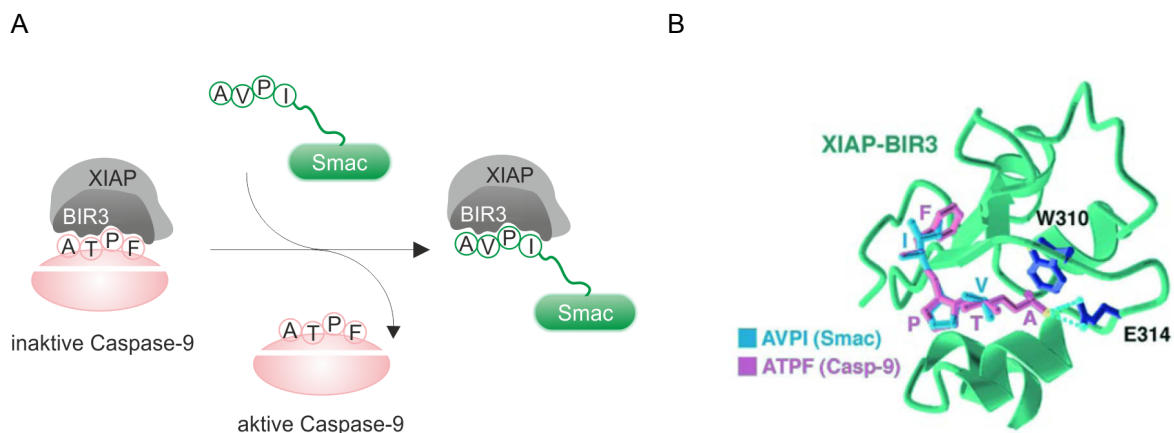


Abbildung 18: A) Schematische Darstellung zur Verdrängung der Caspase-9 aus dem inhibitorischen Komplex mit XIAP durch Smac. B) Computermodell zur Wechselwirkung der Caspase-9 und von Smac mit der BIR3-Domäne von XIAP (aus^[124]).

Die Bindung erfolgt über eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken, van-der-Waals- und hydrophoben Wechselwirkungen der Amino- und Carbonylfunktionen sowie der Seitenketten der vier Aminosäuren mit Aminosäureresten in einer kleinen Bindungstasche der BIR3-Domäne. Dabei ist das N-terminale Alanin essentiell für die Bindung. Die Methylgruppe von Ala1 liegt in einer kleinen hydrophoben Tasche, während die freie Aminofunktion Wasserstoffbrückenbindungen zu den Glu314- und Gln319-Resten und die Carbonylfunktion eine schwache Wasserstoffbrückenbindung zu der Indolaminofunktion des Trp323 der BIR3-Domäne ausbildet. Da die Bindung von Smac an die BIR3-Domäne nur über das kurze Tetrapeptid AVPI vermittelt wird, er-

schließen sich interessante Möglichkeiten, kurze Peptide oder Peptidmimetika als Antagonisten zu XIAP zu untersuchen. Zur Identifizierung von möglichen XIAP-Antagonisten untersuchten mehrere Gruppen die Bindungsaffinitäten kurzer, von Smac abgeleiteter Peptide und Peptidmimetika mit Hilfe von quantitativen Bindungsassays.^[106,108,109,130–132] In einer interessanten Studie von Kipp *et al.* wurde eine Bibliothek von Tetrapeptiden mit Hilfe eines Fluoreszenzassays auf ihre Bindungseigenschaften zur BIR3-Domäne von XIAP untersucht. Die Gruppe konnte den Beitrag der einzelnen Aminosäuren zur Bindung an die BIR3-Domäne quantifizieren. Einige für die vorliegende Arbeit wichtige Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt. Die Anwesenheit des N-terminalen Ala1 ist essentiell und ein Austausch gegen Glycin oder Serin vermindert die Bindungsaffinität stark. Wird Ala1 gegen die unnatürliche Aminosäure 2-Aminobuttersäure (Abu) ausgetauscht, nimmt die Bindungsaffinität zu. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die hydrophoben Wechselwirkungen der verlängerten Seitenkette in der kleinen hydrophoben Tasche der BIR3-Domäne verstärkt werden. Valin auf Position zwei des Smac-Peptids kann durch eine Reihe von Aminosäuren, u. a. Cystein, ersetzt werden, ohne die Bindungsaffinität des Peptids sehr zu beeinflussen (siehe Tabelle 1, $K_D(\text{AVPI}) = 0.48 \mu\text{M}$ und $K_D(\text{ACPI}) = 0.65 \mu\text{M}$).

Tabelle 1: K_D -Werte für ausgewählte Homologe des Smac-Tetrapeptids (ermittelt von Kipp *et al.*).^[106]

Peptidsequenz	K_D (μM)
Smac	0.8
AVPIAQKSE	0.4
AVPI	0.48
AVPC	1.4
ACPI	0.65
AVAF	0.56

Kipp *et al.* zeigten, dass das Peptid AVAF eine vergleichbare Affinität zu BIR3 aufweist wie die natürlichen Smac-Peptide AVPI und AVPIAQKSE, allerdings ist die Affinität um den Faktor 10 kleiner als für das Peptid AVPF. Die Gruppe stellt fest, dass der Austausch des Prolins die Bindungsaffinität von Tetrapeptiden verringern würde. Die hohen Bindungsaffinitäten der Tetrapeptide AVPF, AVPW und AVPY ($K_D = 0.04 - 0.30 \mu\text{M}$) zeigen, dass die Bindung von Smac an die BIR3-Domäne bei Anwesenheit einer aromatischen Seitenkette in der vierten Aminosäure verstärkt wird. Aber auch das Peptid AVPC bindet BIR3, allerdings ist Affinität gegenüber der [C2V]-Variante um mehr als die Hälfte geringer. Interessanterweise zeigten Sharma *et al.* ebenfalls

mit Hilfe eines quantitativen Bindungsassays, dass für eine effektive Bindung von Smac-Peptiden an BIR3 ein Tetrapeptid nötig ist. So ermittelten sie für das Tripeptid AVP einen IC_{50} von $> 10 \mu M$ im Gegensatz zu AVPI mit einem IC_{50} von $0.58 \mu M$.^[109]

3 Zielsetzung

Nukleinsäuretemplat-gesteuerte Reaktionen ermöglichen die Übersetzung der in den Nukleinsäuren kodierten Information in funktionale Moleküle. So wird während der Translation der Nukleinsäurecode in eine Proteinsequenz übertragen und Moleküle mit neuen Funktionalitäten erzeugt. In der templatgesteuerten organischen Synthese werden chemisch modifizierte Nukleinsäuren für die sequenzspezifische Modifizierung von DNA und RNA, bei der Bildgebung und Nukleinsäuredetektion sowie zur Generierung und Entwicklung von Molekülbibliotheken eingesetzt, wobei die programmierbare und hochspezifische Basenerkennung ausgenutzt wird. Nukleinsäure-Hybridisierung kann aber auch zur Freisetzung und Bildung von wirkstoffähnlichen Molekülen führen.

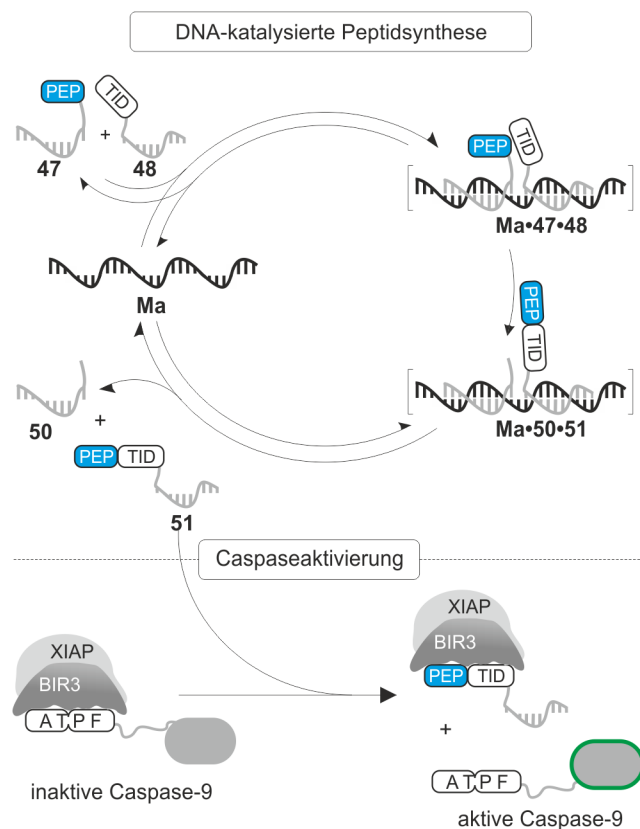


Abbildung 19: Konzept der DNA-katalysierten Peptidsynthese zur Generierung von proapoptotischen Peptiden, die wie Smac als XIAP-Antagonisten wirken und Caspase-9 aktivieren können.

Zielsetzung

Da der gestörte Zustand von erkrankten Zellen sich auch in der Konzentration und Sequenz der exprimierten RNA-Moleküle widerspiegelt, könnte die Nukleinsäure-kodierte Information daher dazu genutzt werden, molekulare Therapien selektiv auf erkrankte Zellen zu richten. Demnach würden krankheitsspezifische Nukleinsäuresequenzen die Bildung oder Freisetzung von Wirkstoffen auslösen. Hier wird ein Ansatz vorgestellt, der es erlaubt, bioaktive Peptide in Gegenwart eines Nukleinsäuretemplats aus ihren inaktiven Fragmenten aufzubauen. Das Reaktionssystem beruht darauf, dass eine Aminoacylgruppe von einem Thioester-modifizierten Donor-PNA-Konjugat **47** auf ein Akzeptor-Peptid-PNA-Konjugat **48** übertragen wird (Abbildung 19). Diese Cys-vermittelte Transferreaktion wird erst durch die benachbarte Hybridisierung von **47** und **48** an einem komplementären DNA-Templat **Ma** ausgelöst. Das entstehende Peptid-PNA-Konjugat **51** wurde so entworfen, dass es die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Caspase-9, einem der Schlüsselenzyme des programmierten Zelltods, und XIAP stört. Diese Proteininteraktion spielt eine wichtige Rolle bei der Resistenz von Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika. Es wurden verschiedene Ansätze beschrieben, Inhibitoren für die BIR3-Domäne von XIAP zu entwickeln, um Krebszellen gegenüber Apoptose zu sensibilisieren.^[97,110,133–135] So wurde gezeigt, dass kurze synthetische Smac-Peptide die Funktion des natürlichen Smac-Proteins imitieren und an die BIR3-Domäne von XIAP binden. Zellgängige 4 - 8mer Smac-Peptide wirkten in Zellen bereits als XIAP-Antagonisten und konnten den Schwellwert für die Induktion der Apoptose in diesen Zellen gegenüber verschiedenen Zytostatika herabsetzen. Die Untersuchungen, besonders von Kipp *et al.*, weisen darauf hin, dass ein Austausch der Aminosäuren an Position 2 und 4 des Smac-Tetrapeptids AVPI gegen Cystein zu aktiven Smac-Mimetika führt.^[106] Andererseits wurde gezeigt, dass das kurze Fragment AVP nur noch eine sehr verminderte Bindungsaffinität zur BIR3-Domäne aufweist.^[109] Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass solche kurzen Smac-Peptide für einen Ansatz zur nukleinsäuregesteuerten Synthese von Wirkstoffmolekülen verwendet werden können. Dabei würde ein funktionales Smac-Peptid aus seinen Fragmenten nur in Anwesenheit eines passenden Nukleinsäuretemplats gebildet werden. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu zeigen, dass das durch den Transfer entstehende Peptid proapoptotische Eigenschaften besitzt und die Funktion des natürlichen Smac-Proteins imitieren kann. Demnach würde das Transferprodukt **51** als XIAP-Antagonist wirken und inhibierte Caspase-9 aktivieren können (Abbildung 19 unten).

Zunächst sollte untersucht werden, ob und wie gut die Produkte aus dem templatkontrollierten Transfer an die BIR3-Domäne von XIAP binden bzw. nachgewiesen werden, dass die Edukte der Transferreaktion keine Affinität zu dem Protein besitzen. Dafür musste ein geeigneter Bindungs-

Zielsetzung

assay entwickelt werden. Dies setzte auch die Expression eines funktionalen BIR3-Proteins voraus. Weiterhin war zu klären, ob *in situ* generierte Peptid-PNA-Konjugate ebenso wie Smac an BIR3 binden, d. h. die Transferreaktion würde mit einem geeigneten Bindungsassay gekoppelt. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Transferreaktion in Anwesenheit des Proteins selektiv und auch katalytisch Peptid-PNA-Konjugate liefert, die anschließend an BIR3 binden. Ferner galt als Ziel, zu zeigen, dass die DNA-katalysierte Peptidsynthese in der Umgebung komplexer Biomakromoleküle erfolgen kann und der inhibierenden Wirkung von XIAP entgegenwirkt. In einem zu entwickelnden Caspase-Assay sollte die durch BIR3 inhibierte Caspase-9 mit Hilfe der *in situ* ablaufenden DNA-katalysierten Peptidsynthese aktiviert werden. Dies sollte nur in Anwesenheit eines komplementären DNA-Templats und einzelbasenselektiv erfolgen. Gelänge die Caspase-Aktivierung auch in Anwesenheit von nur substöchiometrischen Konzentrationen des Templats, wäre eine weitere wichtige Voraussetzung für reale intrazelluläre Anwendungen geschaffen, bei denen in der Regel nur geringe Mengen einer Zielsequenz vorhanden sind.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Entwicklung eines Bindungsassays

Zunächst wurde die Affinität der Peptid-PNA-Konjugate, die in der templatkontrollierten Peptidsynthese eingesetzt wurden, für die BIR3-Domäne von XIAP untersucht. Dazu wurden homogene Bindungsassays entwickelt, die auf der Verdrängung eines fluoreszenzmarkierten, von Smac abgeleiteten Referenzpeptids von der BIR3-Domäne basieren (Abbildung 20). In einem solchen Assay wird ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehenes Referenzpeptid, von dem bekannt ist, dass es BIR3 bindet, mit dem rekombinanten Protein versetzt. Für diesen Komplex ist ein bestimmtes Fluoreszenzsignal messbar (z. B. Fluoreszenzintensität oder Fluoreszenzanisotropie). Bei Zugabe der zu untersuchenden Peptid-PNA-Konjugate sollte das Referenzpeptid vom Protein verdrängt werden, wenn die Chimären eine Affinität zu BIR3 aufweisen. Dabei wird eine Änderung des Fluoreszenzsignals beobachtet. Aus der Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Konzentration der eingesetzten Konjugate lässt sich deren Bindungsaffinität ermitteln.

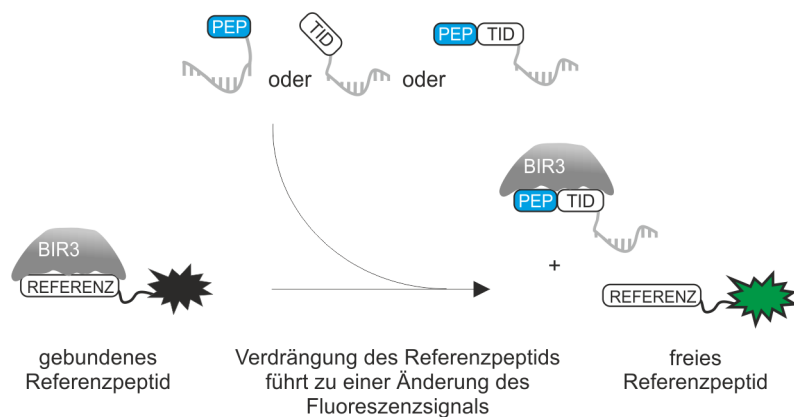


Abbildung 20: Schematische Darstellung eines homogenen Bindungsassays basierend auf der Verdrängung von fluoreszenzmarkierten Referenzpeptiden.

4.1.1 Auswahl geeigneter Peptid-PNA-Konjugate

Im Zuge meiner Diplomarbeit wurden verschiedene Transferreaktionen untersucht (Abbildung 21).^[74–76] In der templatkatalysierten Peptidsynthese dienten die Konjugate **58a** und **58b** als Acyl-donoren durch die Alanin bzw. das Tripeptid AVA auf die Cysteinylopeptide **59a** und **59b** bzw. **59c** übertragen wurden.

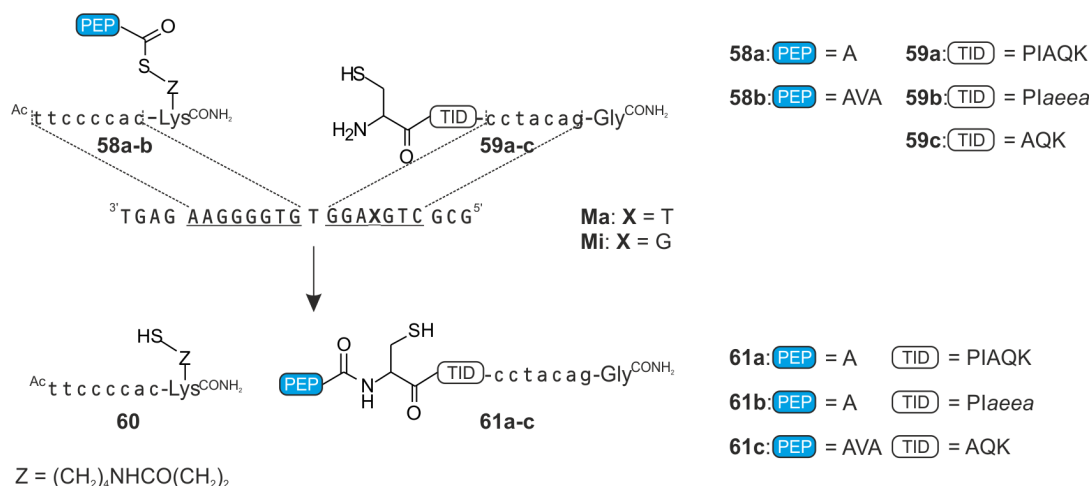


Abbildung 21: Schematische Darstellung des templatkontrollierten Transfers eines Peptidfragments (blau) in **58a - b** auf ein Cysteinyl-Peptid (weiß) in **59a - c**. Die Unterstreichung im DNA-Templat kennzeichnet die zu den PNA-Sequenzen komplementäre DNA-Sequenz. *aeaa* = [2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]acetyl.

Die Donor und Akzeptor-Peptid-PNA-Konjugate binden jeweils nebeneinander an einem komplementären DNA-Templat **Ma**. Dieser DNA-Abschnitt kodiert für einen Teil der karzinogenen Form des Signaltransduktionsproteins Ras, welche die Einzelbasenmutation G12V enthält. Die DNA-Sequenz **Mi** kodiert für das Wildtypprotein und bildet mit **59a - c** eine Einzelbasenfehlpaarung aus. Die Untersuchungen der Diplomarbeit zeigten, dass die Transferreaktionen zwischen **58a** und **59a** bzw. **58a** und **59b** in Gegenwart des komplementären Templats bereits nach 30 min die Peptidprodukte **61a** und **61b** in > 60% Ausbeute lieferten. In Abwesenheit des Templats wurden jeweils nur Spuren der Transferprodukte (0.5%) gebildet. Bei Verwendung des Konjugats **59b**, in dem ein kurzer Oligoethylenglycolteil als Abstandshalter fungierte, beschleunigte das Templat die Reaktion um das 250-fache. Im Gegensatz dazu wurde nur eine 156-fache Reaktionsbeschleunigung erhalten, wenn das Akzeptorkonjugat **59a** verwendet wurde. Die Sequenzspezifität der Peptidsynthese wurde durch Verwendung der einzelbasenfehlpaarenden DNA **Mi** untersucht. Die Transferreaktionen führten an **Mi** nur zu sehr geringen Ausbeuten an Transferprodukten (nach 30 min 8.5% **61a** bzw. 5.2% **61b**). Der Alanintransfer auf das Tripeptid-Linker-PNA-Konjugat **59b** verlief mit höherer Selektivität als jener auf das Hexapeptid-PNA-Konjugat **59a**. Damit erhöhte die Anbindung des Cysteins über einen flexiblen Linker die Effizienz der nukleinsäuregesteuerten Transferreaktion. Auch in Gegenwart von nur 0.1 Äq. des komplementären Templats **Ma** lieferten die Transferreaktionen mit **58a** und den Acylakzeptoren **59a** und **59b** mehr als 60% des jeweiligen Transferprodukts innerhalb von 5 h. Diese Ergebnisse und die geringen Ausbeuten, die in Abwesenheit des Templats erhalten wurden, belegten einen katalytischen

Umsatz der Reaktanden. Für die Transferreaktion mit **58a** und dem Akzeptorkonjugat **59b** konnte bei einer Reaktionszeit von 24 h in Anwesenheit von nur 0.01 Äquivalenten des passenden DNA-Templats **Ma** eine Turnoverzahl von 29 erreicht werden.

Die Peptidsequenzen in **61a** und **61b** enthalten das für die Bindung an die BIR3-Domäne notwendige Tetrapeptidmotiv, wobei **61a** die [C2V]-Variante des Smac-Heptapeptids darstellt (Tabelle 2, Abbildung 21). In **61b** ist die [C2V]-Variante des Smac-Tetrapeptids über einen flexiblen [2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]acetyl (*aeaa*)-Linker an die PNA-Sequenz gebunden.

Es zeigte sich, dass der Transfer eines kurzen Peptidfragments von **58b** auf **59c** um den Faktor 20 langsamer verläuft als der Transfer der einzelnen Aminosäure Alanin. Dies gilt sowohl für die Reaktion am perfekt komplementären Templat, als auch für die Reaktion mit einzelbasenfehlgepaarter DNA **Mi**. Allerdings konnte auch für diese Transferreaktion in geringem Umfang ein katalytischer Umsatz des Templats beobachtet werden. Die Änderung der Peptidsequenz führte aber auch zu einer stärkeren Abweichung vom Smac-Bindungsmotiv im Transferprodukt **61c** (Abbildung 21, Tabelle 2). Über die Affinität von Peptiden gleicher Sequenz wurden bisher keine Untersuchungen durchgeführt. Kipp *et al.* bezogen das Tetrapeptid AVAF in ihren Bindungsassay ein und ermittelten eine hohe Bindungsaffinität, stellten aber auch fest, dass ein Austausch des Prolins im Allgemeinen die Bindungsaffinität der Peptide verringern sollte.^[106]

Tabelle 2: Sequenzvergleich des natürlichen Smac-Peptids mit den Peptidsequenzen der Transferprodukte **61a - c**. Modifizierte Aminosäuren sind grün markiert.

N-terminale Peptidsequenz in Smac:		AVPIAQK
Peptidsequenz in:	61a	ACPIAQK
	61b	ACPI <i>aeaa</i>
	61c	AVACAQK

Im Folgenden wurde ein Bindungsassay für die in der templatkatalysierten Peptidsynthese verwendeten Peptid-PNA-Konjugate entwickelt. Dieser sollte zeigen, ob die den Transferprodukten entsprechenden Konjugate an BIR3 binden können. Die Edukte der Transferreaktion dürfen keine Affinität zu dem Protein besitzen, damit der Ansatz für den templatkatalysierten Aufbau von Wirkstoffen aus inaktiven Vorstufen genutzt werden kann. Für die Experimente musste zunächst das BIR3-Protein gewonnen werden.

4.1.2 Expression des BIR3-Proteins

Die rekombinante BIR3-Domäne (Aminosäuren 252 – 350) des menschlichen XIAP wurde als Fusionsprotein mit einem His-Tag (pET21b(+), Arbeitsgruppe Shi) in *E. coli* BL21(D3) überexprimiert. Dazu wurden Zellkulturen in LB (Luria-Bertani) Medium angelegt und die Expression des Proteins durch Zugabe von IPTG induziert. Anschließend erfolgten der Aufschluss der Zellen und die Aufreinigung des gewünschten Proteins mittels Ni-Affinitätschromatographie. Es folgte ein Pufferaustausch durch Dialyse (20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.4) sowie die Aufkonzentrierung der Proteinlösungen mit Hilfe der *Slide-A-Lyzer*-Konzentrationslösung von *Thermo Scientific*. Die Konzentration der erhaltenen Proteinlösung wurde mittels Bradford-Test bestimmt, die Proben aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Es konnten ca. 34 mg Protein aus insgesamt 3 L Expressionskultur gewonnen werden. Die Reinheit des Proteins wurde durch eine SDS-Page Analyse und MALDI-TOF verifiziert. Sowohl die Gel-Analyse als auch das MALDI-Spektrum zeigen, dass das Protein in hoher Reinheit gewonnen wurde (Abbildung 22). Das Gel zeigt für die aufgetragenen Proteinkonzentrationen jeweils nur eine Bande zwischen 10 kDa und 15 kDa. Das MALDI-Spektrum zeigt den Hauptpeak für $[M+H]^+$ bei $m/z = 12640.8$ sowie einen Peak für $[M+2H]^{2+}$ bei $m/z = 6325.0$. Dies entspricht der Molekülmasse des BIR3-Proteins (AS 252 – 350) plus der His-Markierung.

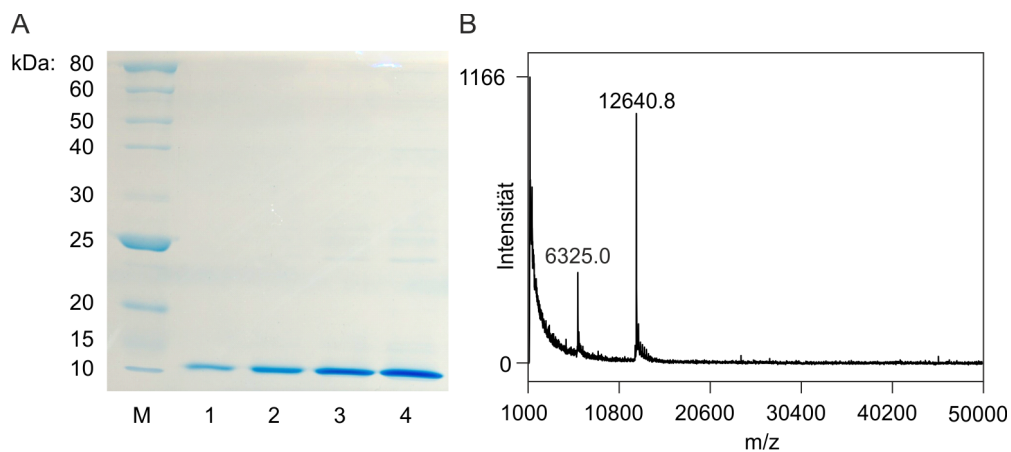


Abbildung 22: a) SDS-Page des gereinigten His-BIR3-Fusionsproteins (BIR3). (Bedingungen: 15% Polyacrylamidgel beladen mit 1 µg, 2 µg, 5 µg und 10 µg (Spur 1 – 4) des gereinigten His-BIR3 sowie dem Proteinmarker (M) (10 – 250 kDa) von NEB als Massenstandard; Laufzeit 60 min bei 120 V); b) MALDI-TOF des gereinigten His-BIR3-Fusionsproteins.

4.1.3 BIR3-Bindungsassay basierend auf Fluoreszenzintensität

Das aufgereinigte BIR3-Protein wurde zunächst in einem homogenen Bindungsassay nach Kipp *et al.* eingesetzt. Dieser basiert auf dem umgebungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff Badan, der

wie in **62** an ein kurzes Smac-Peptid gebunden ist (Abbildung 23A). Wenn dieses in der Bindungstasche der BIR3-Domäne bindet, wechselt der Farbstoff von einer wässrigen Umgebung zur hydrophoben Oberfläche des Proteins. Dies führt sowohl zu einer Verschiebung der Fluoreszenzintensität als auch des Fluoreszenzmaximums (Abbildung 23B). Für die vorliegenden Untersuchungen erfolgte die Fluoreszenzdetektion abweichend von Kipp *et al.* bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm (Kipp *et al.* $\lambda_{\text{ex}} = 387$ nm) sowie Emission von $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm (Kipp *et al.* $\lambda_{\text{ex}} = 470$ nm).

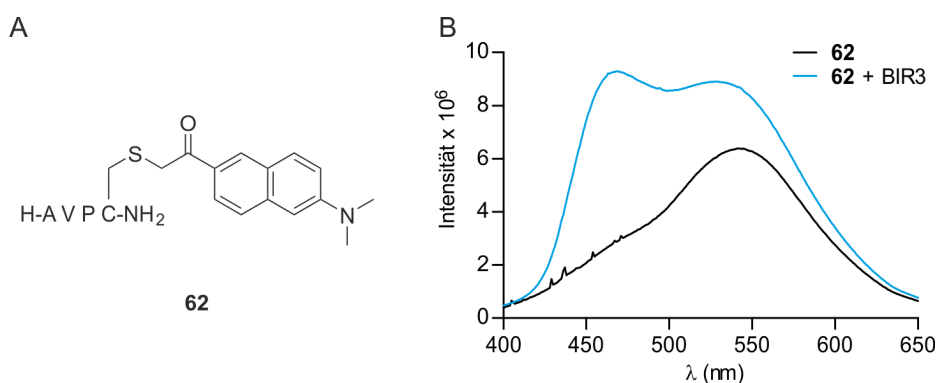


Abbildung 23: A) Struktur des Badan-markierten Referenzpeptids **62**. B) Emissionsspektrum von **62** in Ab- und Anwesenheit von BIR3-Protein. Bedingungen: 2 μM **62** und 4 μM BIR3 in 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.1% BSA, pH 7; $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm.

Bestimmung der Bindungskonstante für die Bindung des Referenzpeptids **62** an die BIR3-Domäne

Für die Bestimmung von Bindungskonstanten gilt im Allgemeinen, dass die Konzentration eines Bindungspartners (BP1) konstant und unterhalb des K_D ($\text{BP1}/K_D < 0.1$) gehalten wird. Der zweite Bindungspartner wird dann in Konzentrationen von 20 - 100fach unter dem K_D bis 50 - 100fach über dem K_D zugegeben. Kipp *et al.* titrierten allerdings eine Lösung von 2 μM **62** mit BIR3 (0 μM – 10 μM) und bestimmten einen K_D von 0.3 μM für das Referenzpeptid **62** zur BIR3-Domäne. Daher wurde zunächst untersucht, ob die von den Autoren verwendeten Konzentrationen verringert werden konnten. Für die Bindungsexperimente wurden 30 nM Badan-markiertes Peptid **62** in Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.1% BSA, pH 7) mit der BIR3-Domäne (0 μM – 45 μM) titriert und die Änderung der Fluoreszenz beobachtet (nicht gezeigt). Im Verlauf der Messungen zeigte sich aber, dass die ermittelten Fluoreszenzintensitäten stark schwankten und die erhaltenen Daten nicht reproduzierbar waren. Bei Beobachtung der Fluoreszenz einer Lösung von 30 nM Referenzpeptid **62** in Puffer über die Zeit beobachtet

wurde eine Abnahme der Fluoreszenzintensität beobachtet (nicht gezeigt). Es wird vermutet, dass das Referenzpeptid **62** an den Gefäßwänden adsorbierte und damit der Lösung entzogen wurde. Bei einer hohen Konzentration von **62** würden die Gefäßwände zunächst gesättigt und die gemessene Fluoreszenzintensität für das verbleibende gelöste Peptid konstant bleiben. Demnach war eine Anpassung der Methode hinsichtlich geringerer Konzentrationen an Referenzpeptid und BIR3-Protein nicht möglich. Im Folgenden wurden die Bindungsexperimente wie bei Kipp *et al.* beschrieben durchgeführt, d. h. 2 μM **62** wurden mit steigenden Konzentrationen von BIR3 (0 – 20 μM) titriert. Mit steigender Konzentration von BIR3 wurde das Referenzpeptid **62** zunehmend am Protein gebunden und die Fluoreszenz stieg an bis eine Sättigung erreicht wurde (Abbildung 24). Bei Zugabe einer Pufferlösung ohne BIR3-Protein blieb die Fluoreszenzintensität konstant. Durch nichtlineare Regression und unter Annahme eines *single site*-Bindungsmodells konnte ein K_D -Wert von 1.33 μM für die Bindung des Badan-Peptides **62** an die BIR3-Domäne ermittelt werden.

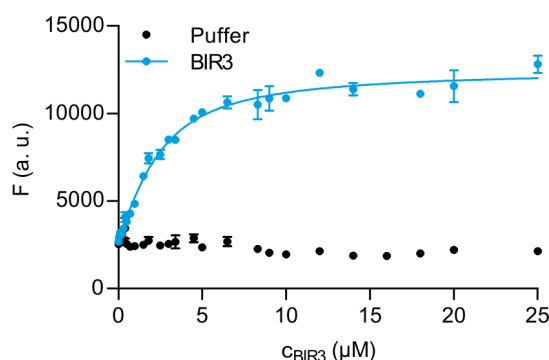


Abbildung 24: Fluoreszenztitration des Referenzpeptids **62** mit BIR3-Protein oder mit Puffer. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Messungen. Bedingungen: 2 μM **62** in 50 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.1% BSA, pH 7 wurden mit steigenden Konzentrationen von BIR3 (0 μM – 20 μM) versetzt; $V_{\text{Well}} = 50 \mu\text{L}$, gering-bindende Mikrotiterplatte, 15 min Äquilibrium bei 25 $^{\circ}\text{C}$, $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$ bei 29 $^{\circ}\text{C}$. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

Kompetitionsexperimente

Weitere Experimente sollten zeigen, ob auch die in der Transferreaktion verwendeten Peptid-PNA-Konjugate an die BIR3-Domäne binden. Die Affinität der verschiedenen Peptid-PNA-Konjugate kann in Kompetitionsexperimenten ermittelt werden. Dabei wird ein Komplex aus Referenzpeptid und Protein in Puffer vorgelegt und anschließend die Kompetitoren in steigender Konzentration zugegeben. Das Referenzpeptid **62** wird von den Kompetitoren aus der Bindungs-

tasche des Proteins verdrängt, wodurch die Fluoreszenzintensität des Referenzpeptids abnimmt. Aus den erhaltenen Daten lassen sich mittels nichtlinearer Regression IC_{50} -Werte berechnen.

Es wurde eine Stammlösung von 2 μ M **62** und 8 μ M BIR3 in Puffer vorgelegt und dann jeweils steigende Konzentrationen der Peptid-PNA-Konjugate zugegeben. Zum Vergleich mit den von Kipp *et al.* ermittelten Ergebnissen der IC_{50} -Messungen wurde zunächst das Tetrapeptid **63** (ACPI, Abbildung 25A) synthetisiert und im Kompetitionsassay eingesetzt (Abbildung 25A). Dabei wurde mit einem IC_{50} -Wert von 1.37 μ M gegenüber Kipp *et al.* ($IC_{50} = 0.65 \mu$ M) eine zweimal geringere Affinität des Peptids ermittelt. Weiterhin wurde ein PNA-Konjugat des Smac-Heptapeptids **64** (Abbildung 25A) synthetisiert. Das Konjugat **64** kann das Referenzpeptid ebenfalls aus der Bindungstasche von BIR3 verdrängen. Aus der Bindungskurve wurde ein IC_{50} von 4.10 μ M berechnet (Abbildung 25A). Demnach würde die Anbringung einer kurzen PNA-Sequenz in **64** die Bindungsaffinität geringfügig verringern.

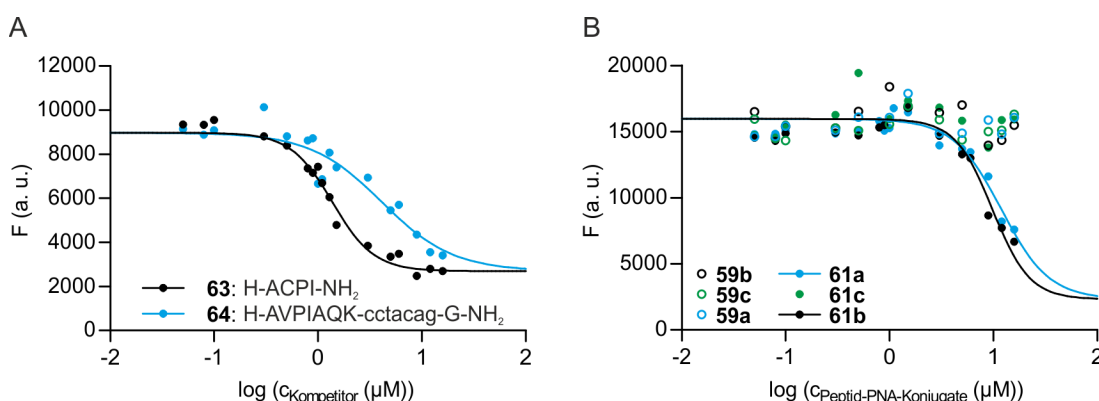


Abbildung 25: IC_{50} Messungen mit den Peptid-PNA-Konjugaten A) **63** und **64** und B) **59a - c** und **61a - c**. Bedingungen: 2 μ M **62** und 8 μ M BIR3 in 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.1% BSA, pH 7 wurden mit steigenden Konzentrationen von **63**, **64**, **59a - c**, **61a - c** (0 μ M – 16 μ M) versetzt; $V_{Well} = 50 \mu$ L, gering-bindende Mikrotiterplatte, 15 min Äquilibrierung bei 25 °C, $\lambda_{ex} = 380$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm bei 30 °C.

Die Ergebnisse der Konkurrenzexperimente zeigen weiterhin, dass die Cysteinylopeptid-PNA-Konjugate **59a - c**, welche nur die Peptidfragmente tragen, nicht an die BIR3-Domäne binden konnten (Abbildung 25B). Die PNA-Sequenzen **61a** und **61b**, welche die Smac-Peptide tragen, verdrängten das Referenzpeptid **62** vom Protein. Aus den erhaltenen Kurven lassen sich IC_{50} -Werte berechnen. Dabei wurde für **61a** ein Wert von 13.03 μ M und für **61b** ein Wert von 10.84 μ M erhalten. Beide Peptid-PNA-Konjugate binden also vergleichbar an die Proteindomäne, aber schlechter als das Nonapeptid AVPIAQKSE von Kipp *et al.* bzw. die Peptid-PNA-Chimäre **64**, welche die natürliche Smac-Sequenz aufweist. Die Aminosäuresequenz des Peptid-PNA-

Konjugats **61c** weicht offenbar zu stark von der des natürlichen Smac-Peptids ab und zeigte keine Affinität zu BIR3 (Abbildung 25B).

Bindungsexperimente im Transferpuffer

Die Experimente wurden bisher in dem von Kipp *et al.* verwendeten Puffer durchgeführt. Allerdings wurde die Transferreaktion während der Arbeiten zur Diplomarbeit in einem anderen Puffer optimiert. Insbesondere das von Kipp *et al.* verwendete Dithiol DTT (Dithiothreitol) musste durch ein alternatives Reduktionsmittel ersetzt werden, da die Thioester **58a** und **58b** durch Thiole nukleophil angegriffen werden können.

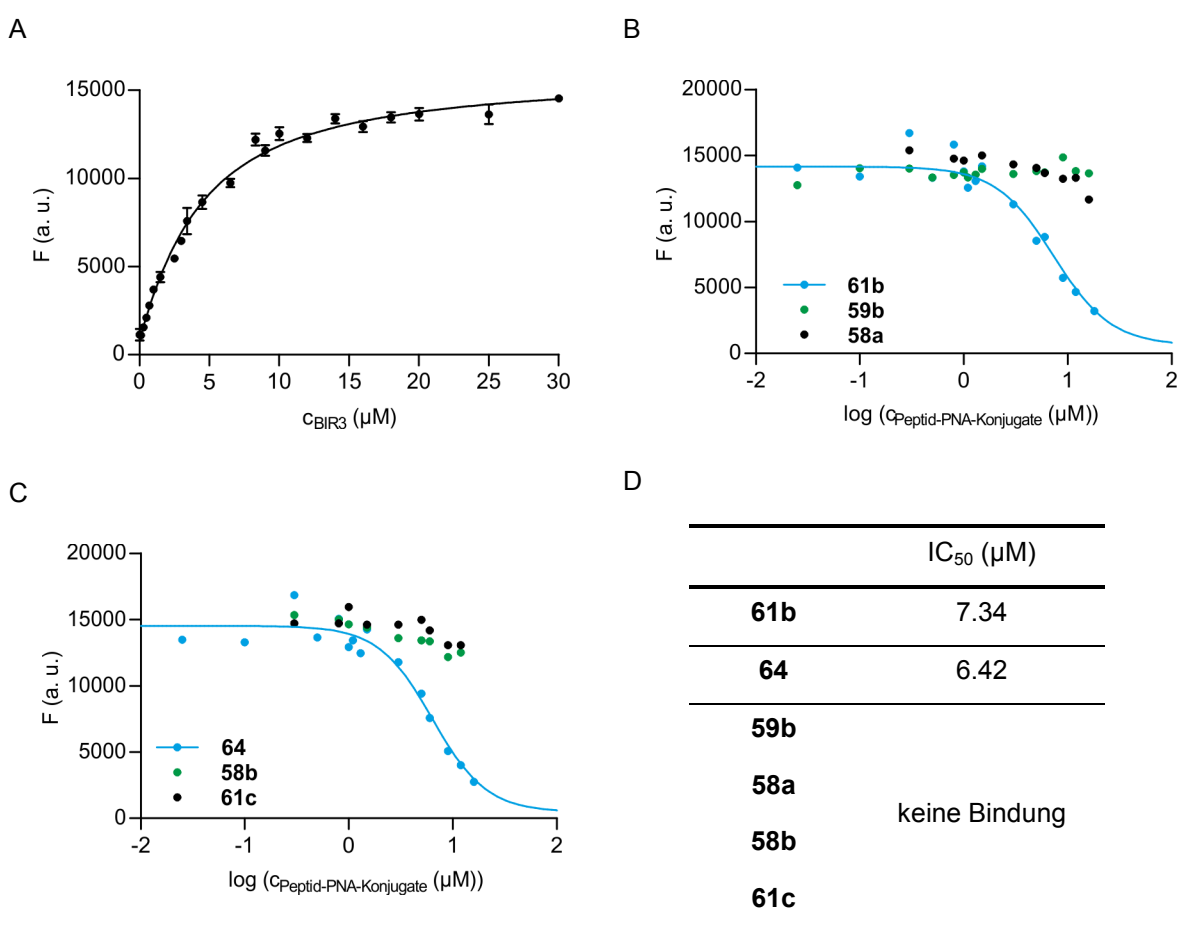


Abbildung 26: A) Fluoreszenztitration des Referenzpeptids **62** mit BIR3 (Mittelwert aus drei Messungen). Bedingungen: 2 μM **62** in 10 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, 0.2 mM TCEP, 0.2 mg/mL BSA, pH 7 wurden mit steigenden Konzentrationen von BIR3 (0 μM – 20 μM) versetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler. B) IC₅₀-Messungen mit Peptid-PNA-Konjugaten **58a**, **59a** und **61b** sowie C) **58b**, **61c** und **64**. Bedingungen: 2 μM **62** und 8 μM BIR3 in 10 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, 0.2 mM TCEP, 0.2 mg/mL BSA, pH 7 wurden mit steigenden Konzentrationen von **58a**, **59a**, **61b**, **58b**, **61c**, **64** (0 μM – 16 μM) versetzt. $V_{well} = 50 \mu\text{L}$, gering-bindende Mikrotiterplatte, 15 min Äquilibrierung bei 25 °C, $\lambda_{ex} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$ bei 30 °C. D) Übersicht über die berechneten IC₅₀-Werte für die jeweiligen Peptid-PNA-Konjugate.

Daher wurden sowohl die Bindungs- als auch die Konkurrenzexperimente bei veränderter Pufferzusammensetzung (10 mM NaH_2PO_4 , 200 mM NaCl, 0.2 mM TCEP, 0.2 mg/mL BSA, pH 7) durchgeführt und Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) als Reduktionsmittel eingesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 26 zusammengefasst. Im angepassten Puffer wurde für das Referenzpeptid **62**, im Gegensatz zum vorher verwendeten Puffer, ein leicht erhöhter K_D -Wert von $3.3 \mu\text{M}$ bestimmt (Abbildung 26A). Die den Transferedukten entsprechenden Peptid-PNA-Konjugate **58a**, **58b** und **59b** zeigten keine Affinität zur BIR3-Domäne, während das Konjugat **64**, welches das Smac-Heptapeptid trägt, mit einem IC_{50} von $6.42 \mu\text{M}$ und damit ähnlich wie im Kipp-Puffer gebunden wurde. Das Transferprodukt **61b** band mit einem IC_{50} von $7.34 \mu\text{M}$ vergleichbar gut, während **61c** auch hier keine Affinität zur BIR3-Domäne aufwies (Abbildung 26B-D).

4.1.4 BIR3-Bindungsassay basierend auf Fluoreszenzanisotropie

Ausgehend von den Untersuchungen von Nikolovska-Coleska *et al.* wurde auch ein Fluoreszenzanisotropieassay zur Untersuchung der Bindungsaffinitäten der Peptid-PNA-Konjugate verwendet.^[107,108,131] Der homogene Bindungsassay basiert auf der Verdrängung des fluoreszenzmarkierten von Smac abgeleiteten Peptids **65** (Abbildung 27) von der BIR3 Domäne.

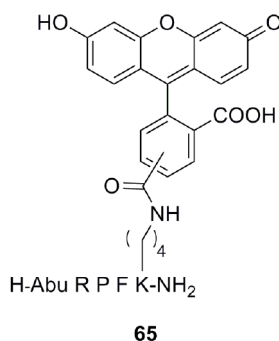


Abbildung 27: Struktur des Referenzpeptids **65**. (Abu = 2-Aminobuttersäure)

Das fluoreszenzmarkierte Molekül polarisiert im freien und im gebunden Zustand linearisiertes Licht jeweils unterschiedlich. Die Fluoreszenzanisotropie erlaubt damit das direkte Auslesen der Konzentration an gebundenem Liganden. Bei Vorgabe einer konstanten Konzentration an markiertem Liganden und Rezeptor (BIR3) kann die Konzentration eines Kompetitors variiert werden. Da sich die Fluoreszenzanisotropie aus dem Anteil von ungebundenem und gebundenem Referenzpeptid ergibt, kann die Dissoziationskonstante K_D bzw. der IC_{50} -Wert aus den erhaltenen Messwerten bestimmt werden. Laut den Ergebnissen der Gruppe um Nikolovska-Coleska war zu

erwarten, dass für diesen Assay geringere Konzentrationen des Referenzpeptids und des Proteins als die im Fluoreszenzintensitätsassay verwendeten nötig sind. Folglich würden auch im Kompetitionsassay geringere Konzentrationen der Peptid-PNA-Konjugate eingesetzt werden.

Bestimmung der Bindungskonstante für die Bindung des Referenzpeptids **65** an die BIR3-Domäne

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Bindung des Referenzpeptids **65** an die BIR3-Domäne erfolgte durch Titration von BIR3 (0 nM – 800 nM) zu einer 5 nM Lösung von **65** im von Nikolovska-Coleska *et al.* verwendeten Puffer (100 mM NaH₂PO₄, 100 µg/mL BSA, 0.02% NaN₃, pH 7.5). Die erhaltenen Anisotropiewerte wurden normalisiert und der K_D mittels nichtlinearer Regression bestimmt. Demnach ergab sich ein K_D-Wert von 75.5 nM, der damit etwas höher aber in der gleichen Größenordnung wie die von Nikolovska-Coleska *et al.* bestimmte Dissoziationskonstante (17.9 nM) ist.

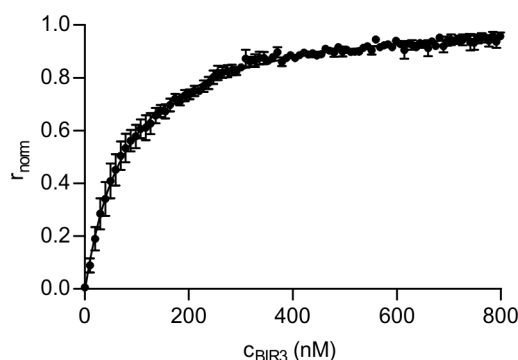


Abbildung 28: Fluoreszenzanisotropie-Titration des Referenzpeptids **65** mit BIR3-Protein Bedingungen: 5 nM **65** in 100 mM NaH₂PO₄, 0.1 µg/mL BSA, 0.02% NaN₃, pH 7.5 wurden mit BIR3 (0 nM – 800 nM) titriert; bei 25 °C, λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 530 nm (r_{norm} = normierte Anisotropie). Dargestellt sind die normierten Mittelwerte aus fünf Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

Kompetitionsexperimente

Die Ergebnisse des fluoreszenzbasierten Bindungsassays ließen darauf schließen, dass die den Transferprodukten entsprechenden Peptid-PNA-Konjugate **58a**, **58b**, **59a** - **c** keine Affinität zur BIR3-Domäne aufweisen. Von den Transferprodukten **61a** – **c** zeigten **61a** und **61b** eine dem Smac-Peptid-PNA-Konjugat ähnliche Bindungsaffinität, während **61c** nicht an BIR3 bindet und das Referenzpeptid **65** nicht verdrängen konnte. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Ergebnisse mit Hilfe des auf Fluoreszenzanisotropie basierenden Kompetitionsassay reproduziert werden konnten. Hierzu wurde eine 5 nM Lösung des Referenzpeptides **65** in Puffer mit 270 nM

BIR3 versetzt und jeweils die Fluoreszenzanisotropiewerte für das freie und das vollständig gebundene Peptid gemessen. Anschließend wurden die Peptid-PNA-Konjugate **61a**, **61c** und **64** in steigender Konzentration zugegeben und jeweils die Fluoreszenzanisotropie gemessen. Die erhaltenen Werte wurden normalisiert und gegen die Konzentration der Peptid-PNA-Konjugate aufgetragen und daraus mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung eines sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Modells mit variabler Steigung die IC_{50} -Werte ermittelt (Abbildung 29A). Die ermittelten Daten zeigen, dass das Peptid-PNA-Konjugat **61c** keine Affinität zur BIR3-Domäne aufweist. Das Transferprodukt **61a** zeigt eine ähnlich starke Bindung wie das Peptid-PNA-Konjugat **64**, welches die natürliche Smac-Sequenz trägt. Die berechneten IC_{50} -Werte sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Bei Titration mit Pufferlösung wird das Referenzpeptid **65** nicht vom BIR3-Protein verdrängt. Für die Experimente konnten sehr viel kleinere Konzentrationen an Referenzpeptid und Protein verwendet werden und die ermittelten IC_{50} -Werte sind um eine Größenordnung kleiner als beim fluoreszenzintensitätsbasierten Assay mit Referenzpeptid **62** (vgl. Kapitel 4.1.3).

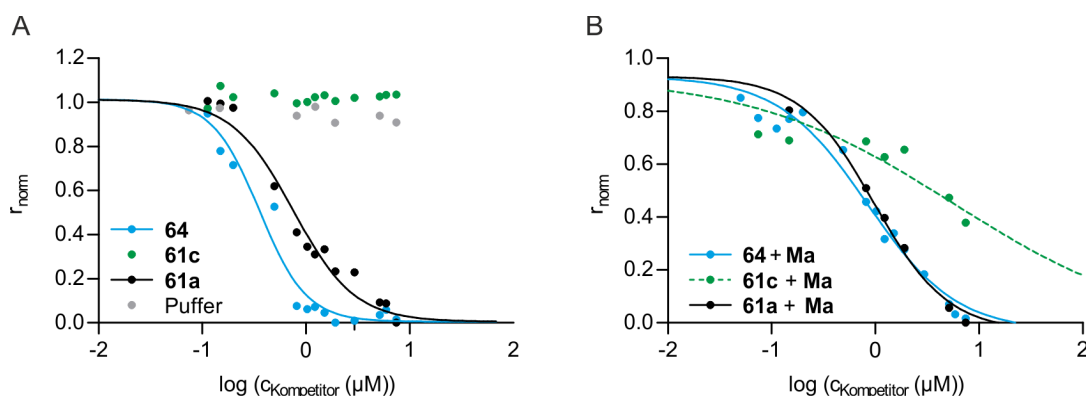


Abbildung 29: A) Inhibitionskurven der Peptid-PNA-Konjugate **61a**, **61c** und **64** sowie der Pufferkontrolle. B) Inhibitionskurven der entsprechenden DNA-Komplexe. Bedingungen: 5 nM Referenzpeptid **65** und 270 nM BIR3 in 100 mM NaH_2PO_4 , 0.1 μ g/mL BSA, pH 7.5 wurden A) mit steigenden Konzentrationen von **61a**, **61c** und **64** (0 μ M – 7.4 μ M) und zur Kontrolle nur mit Puffer und B) mit steigenden Konzentrationen der DNA-Komplexe von **61a**, **61c** und **64** (0 μ M – 7.4 μ M) mit 2 Äq. DNA **Ma** versetzt.

Tabelle 3: IC_{50} -Werte der Peptid-PNA-Konjugate **61a**, **61c** und **64** und ihrer Komplexe mit DNA **Ma**.

Peptid-PNA-Konjugat	IC_{50} (μ M) ohne Ma	IC_{50} (μ M) mit Ma
H ₂ N-AVPIAQK-PNA 64	0.43	0.78
H ₂ N-ACPIAQK-PNA 61a	0.57	0.95
H ₂ N-AVACAQK-PNA 61c	-	4.56

Im Verlauf der Untersuchungen sollten die Transferreaktionen aus Kapitel 4.1.1 in Gegenwart des BIR3-Proteins ablaufen und gezeigt werden, dass die *in situ* generierten Transferprodukte an das Protein binden können. In der Reaktionslösung liegt dann neben dem BIR3-Protein und den Peptid-PNA-Konjugaten die Templat-DNA **Ma** oder **Mi** vor. Daher wurde untersucht, inwieweit die Anwesenheit der Templat-DNA die Bindung der Peptid-PNA-Konjugate an das Protein beeinflusst. Die Peptid-PNA-Konjugate **61a**, **61c** und **64** wurden zusammen mit je 2 Äq. **Ma** in Puffer gelöst und diese Lösung für die IC₅₀-Messungen verwendet. Für die Peptid-PNA-Konjugate **61a** und **64** änderten sich die ermittelten IC₅₀-Werte nur marginal (Abbildung 29, Tabelle 3). Interessanterweise erhöhte sich jedoch die Affinität des Konjugats **61c** zum BIR3-Protein in Anwesenheit von **Ma**. Wurde vorher im untersuchten Konzentrationsbereich keine Verdrängung des Referenzpeptids **65** beobachtet, so konnte nun ein IC₅₀ von 4.56 µM berechnet werden. Ein weiteres Verdrängungsexperiment zeigte, dass das DNA-Templat **Ma** allein ebenfalls das Referenzpeptid **65** verdrängen kann und das BIR3-Protein mit einem IC₅₀ von 14.20 µM bindet (Abbildung 30A). Dagegen kann das PNA-Oligomer allein, d. h. ohne Peptidligand nicht an das Protein binden (**66** in Abbildung 30A).

Die hier vorliegende einzelsträngige DNA sollte keine Bindungsmotive für eine Protein-DNA-Wechselwirkung aufweisen. DNA-Einzelstränge können in Form von G-Quadruplexen oder Aptameren Proteinbindungsaffinitäten aufweisen. Dies ist allerdings stark sequenzabhängig, d. h. nur bestimmte DNA-Sequenzen können Sekundärstrukturen ausbilden, die eine Wechselwirkung mit Proteinen erlauben. Aptamere werden in einem aufwendigen Selektionsprozess für ihre Proteinbindung optimiert. Die Bindung des DNA-Templats **Ma** könnte daher auf unspezifische Wechselwirkungen des negativ geladenen Phosphatrückgrats der DNA mit den Aminosäureresten der BIR3-Bindungstasche zurückzuführen sein. In diesem Fall sollte die Affinität der DNA zum Protein von der DNA-Sequenz unabhängig aber von der Länge des Oligomers abhängig sein. Im folgenden Kompetitionsexperiment wurden daher verschiedene DNA-Sequenzen **67** - **69** untersucht (Abbildung 30B). Sowohl **Ma** als auch deren verkürzte Sequenz **67** wurden an die BIR3-Domäne gebunden. Dabei zeigte **67** eine zweimal geringere Bindungsaffinität als die längere Sequenz **Ma** (IC₅₀(**67**) = 32.0 µM vs. IC₅₀(**Ma**) = 14.20 µM). Dieses Ergebnis spricht für eine unspezifische Wechselwirkung des Phosphatrückgrats mit dem Protein, da mit steigender Anzahl an negativen Ladungen die Affinität des Oligomers zunimmt. Allerdings zeigten die zufällig ausgewählten DNA-Sequenzen **68** und **69** keine Affinität, womit eine DNA-sequenzspezifische Wechselwirkung ebenfalls nicht ausgeschlossen werden konnte.

In weiteren Experimenten wurde die Affinität der DNA zur BIR3-Domäne detaillierter untersucht. Ist diese trotz der scheinbaren Sequenzspezifität auf eine Wechselwirkung des Rückgrats mit einzelnen Aminosäureresten des Proteins zurückzuführen, so könnten auch andere Polyanionen wie Polyacrylsäure (**PAA**, Abbildung 30D) mit dem Protein wechselwirken. Andererseits sollte durch Zugabe von Kationen, die die negative Ladung des DNA-Rückgrats stabilisieren, die Affinität der DNA zum Protein abnehmen. Die Konkurrenzexperimente wurden deshalb mit dem Polyanion Polyacrylsäure durchgeführt. Es wurde eine Polyacrylsäure mit einem Molekulargewicht von 2000 g/mol gewählt, da diese ca. 20 negative Ladungen aufweist. Die DNA-Sequenz von **Ma** ist ein 23mer und besitzt 22 negativ geladene Phosphatgruppen. Damit zeigen beide Moleküle einen vergleichbaren Ladungszustand. Allerdings wurde auch bei hohen Konzentrationen (0 mM – 0.5 mM) keine Wechselwirkung des Polyanions **PAA** mit dem BIR3-Protein beobachtet (Abbildung 30C).

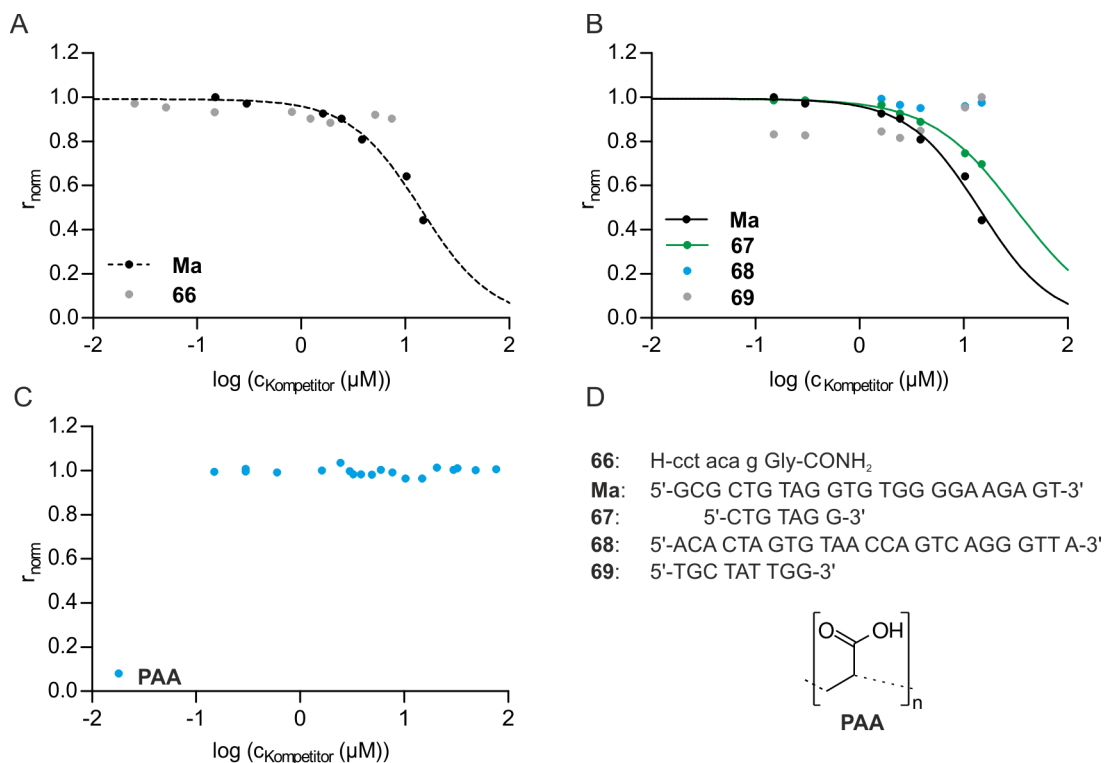


Abbildung 30: A) IC₅₀-Messungen für die DNA **Ma** und die PNA **66**. B) IC₅₀-Messungen für die DNA-Sequenzen **67 – 69**; die Inhibitionskurve von **Ma** ist zum Vergleich noch einmal abgebildet. C) Konkurrenzexperiment mit Polyacrylsäure **PAA**. Bedingungen: 5 nM Referenzpeptid **65** und 270 nM BIR3 in 100 mM NaH₂PO₄, 0.1 mg/mL BSA, pH 7.5 wurden mit steigenden Konzentrationen von A) und B) DNA **Ma**, **67 – 69** und PNA **66** (0 μ M – 14 μ M) und C) **PAA** (0 μ M – 29 μ M) versetzt. D) Übersicht über die Sequenzen der untersuchten DNA- und PNA-Sequenzen und Darstellung der Struktur von Polyacrylsäure **PAA**.

Sowohl Mg^{2+} -Ionen als auch das Polykation Spermin (**70**) (Abbildung 31C) werden eingesetzt, um DNA-Duplexe zu stabilisieren, indem sie die negative Ladung des Phosphatrückgrats kompensieren und damit die Abstoßung zwischen den polyanionischen DNA-Einzelsträngen verringern.^[9,136,137] Im Weiteren wurde untersucht, ob die Zugabe von Kationen zum Puffer die Wechselwirkung der DNA **Ma** mit BIR3 schwächen könnte. Dazu wurde der Puffer für die Konkurrenzexperimente jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen an MgCl_2 (Abbildung 31A) bzw. Spermin (Abbildung 31B) versetzt und die Verdrängung des Referenzpeptids **65** von der BIR3-Domäne durch die DNA **Ma** beobachtet.

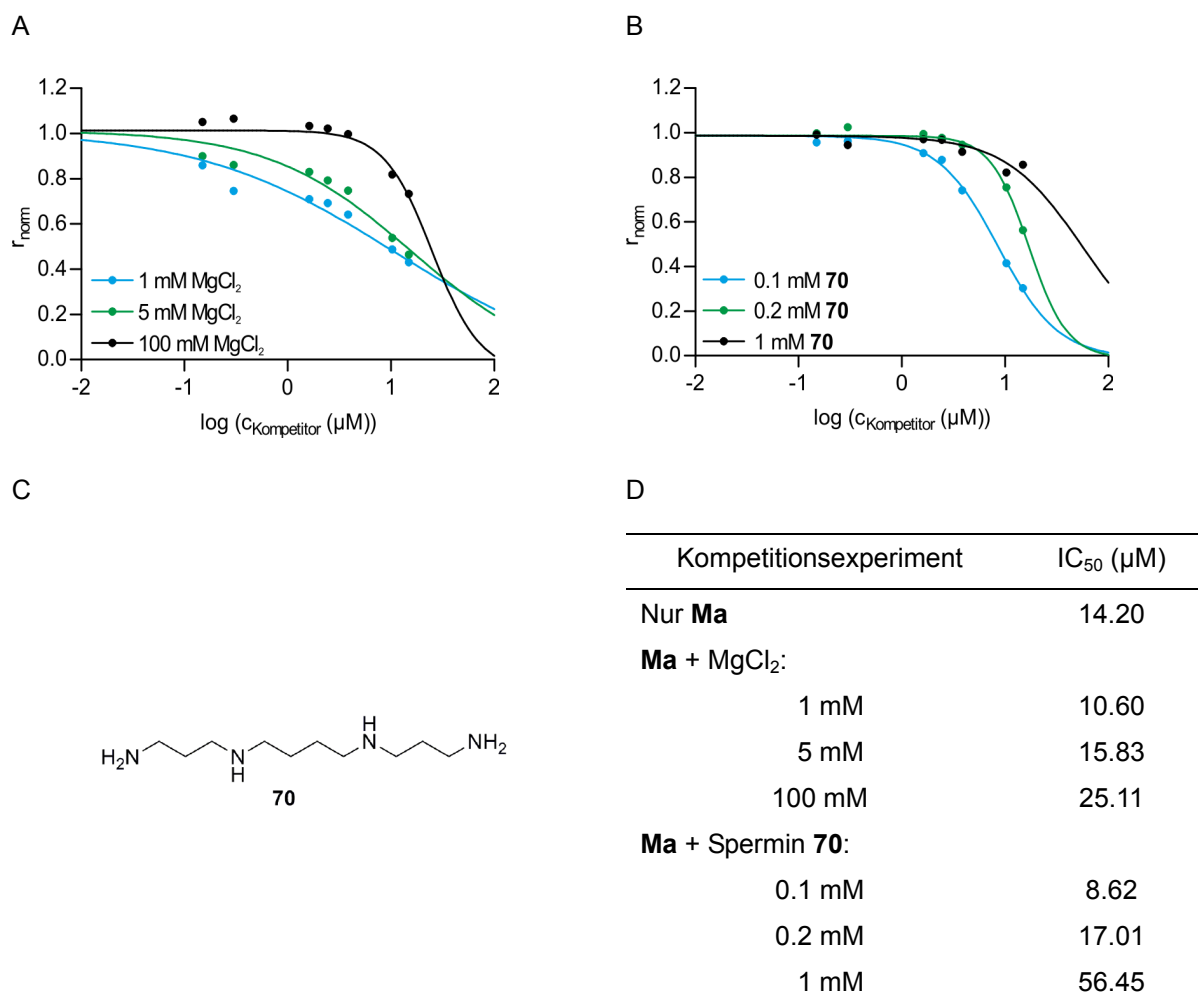


Abbildung 31: IC_{50} -Messungen für die DNA **Ma** mit verschiedenen Konzentrationen an A) MgCl_2 bzw. B) Spermin (**70**) als Pufferzusatz. Bedingungen: 5 nM Referenzpeptid **65** und 270 nM BIR3 in 100 mM NaH_2PO_4 , 0.1 mg/mL BSA, pH 7.5 mit den jeweils angegebenen Konzentrationen von MgCl_2 oder Spermin wurden mit steigenden Konzentrationen von DNA **Ma** (0 μM – 14 μM) titriert. C) Struktur von Spermin. D) Übersicht über die ermittelten IC_{50} -Werte für die DNA **Ma** in unterschiedlich zusammengesetzten Puffern.

Die Inhibitionskurven in Abbildung 31 und die berechneten IC_{50} -Werte (Abbildung 31D) zeigen, dass die Affinität von **Ma** bei höheren Konzentrationen von $MgCl_2$ bzw. Spermin verringert werden kann. Zur genaueren Untersuchung und Quantifizierung einer unspezifischen Bindung der DNA-Sequenz **Ma**, könnte die DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und in einem Sättigungsexperiment mit anschließender Verdrängung mittels der unmarkierten Sequenz eingesetzt werden.

Bindungsexperimente in einem optimierten Puffer

Der auf Fluoreszenzanisotropie basierte Bindungsassay muss auch in einem für die Transferreaktion geeigneten Puffer, d. h. in Gegenwart von TCEP als Reduktionsmittel funktionieren. Zusätzlich haben die Vorexperimente gezeigt, dass die Anwesenheit von Kationen wie Mg^{2+} und Spermin die Verdrängung des Referenzpeptids **65** durch das DNA-Templat **Ma** verringern kann. Daher wurden im Folgenden die Bindungsexperimente in einem 100 mM NaH_2PO_4 -Puffer (pH 7.5) mit 10 mM NaCl, 0.1 mM Spermin, 0.1 mg/mL BSA, 10 mM $MgCl_2$ und 0.2 mM TCEP durchgeführt. In dem neuen Puffersystem wurde für das Referenzpeptid **65** ein K_D von 59.50 nM bestimmt (Abbildung 32A). Dieser ist damit nur wenig geringer als der zuvor bestimmte K_D von 75 nM. Die den Transferprodukten entsprechenden Donor- und Akzeptor-Konjugate **58a**, **59a** und **59b** konnten das Referenzpeptid **65** nicht von der BIR3-Domäne verdrängen (Abbildung 32C). Für das DNA-Templat **Ma** ergab sich ein $IC_{50} > 200 \mu M$. Damit war das DNA-Oligomer **Ma** in dem verwendeten Puffer nur noch eingeschränkt in der Lage, das Referenzpeptid **65** vom Protein zu verdrängen. Die den Transferprodukten entsprechenden Hybride **61a** und **61b** banden mit vergleichbarer Affinität an das Protein und auch vergleichbar gut wie das Konjugat mit der natürlichen Smac-Sequenz (**64**) (Abbildung 32B, Tabelle 4), wobei für **61a**, dem Konjugat mit der längeren Peptidsequenz, ein etwas höherer IC_{50} -Wert ermittelt wurde. Auch Nikolovska-Coleska *et al.* beobachteten, dass das Pentapeptid in **65** eine höhere Bindungsaffinität besitzt als das längere Homolog AbuRPFAQK(FAM).^[108] Die bisherigen Messungen zeigten auch, dass das Referenzpeptid **65** nie vollständig vom BIR3-Protein verdrängt wurde. Dies ist zum einen auf die geringere Affinität der Peptid-PNA-Konjugate im Gegensatz zum Referenzpeptid zurückzuführen, andererseits wird ein geringer Anteil von **65** auch unspezifisch am Protein binden. Die Sättigungskurve aus Abbildung 32A gibt dann die Gesamtbindung als Summe der spezifischen und unspezifischen Bindung wieder. Um den Anteil an unspezifischer Bindung zu ermitteln, wurde ein Verdrängungsexperiment mit dem unmarkierten Peptid **71** durchgeführt (Abbildung 32D). Der Ligand **71** wurde in einem mehr als 100fachen Überschuss zugegeben und besetzte

hauptsächlich die spezifische Bindungsstelle. Der verbleibende gebundene markierte Ligand **65** ist nicht verdrängbar und wurde unspezifisch gebunden. Aus der Verdrängungskurve ist ersichtlich, dass im Bindungsexperiment ca. 10% des Referenzpeptids **65** unspezifisch von BIR3 gebunden wurden.

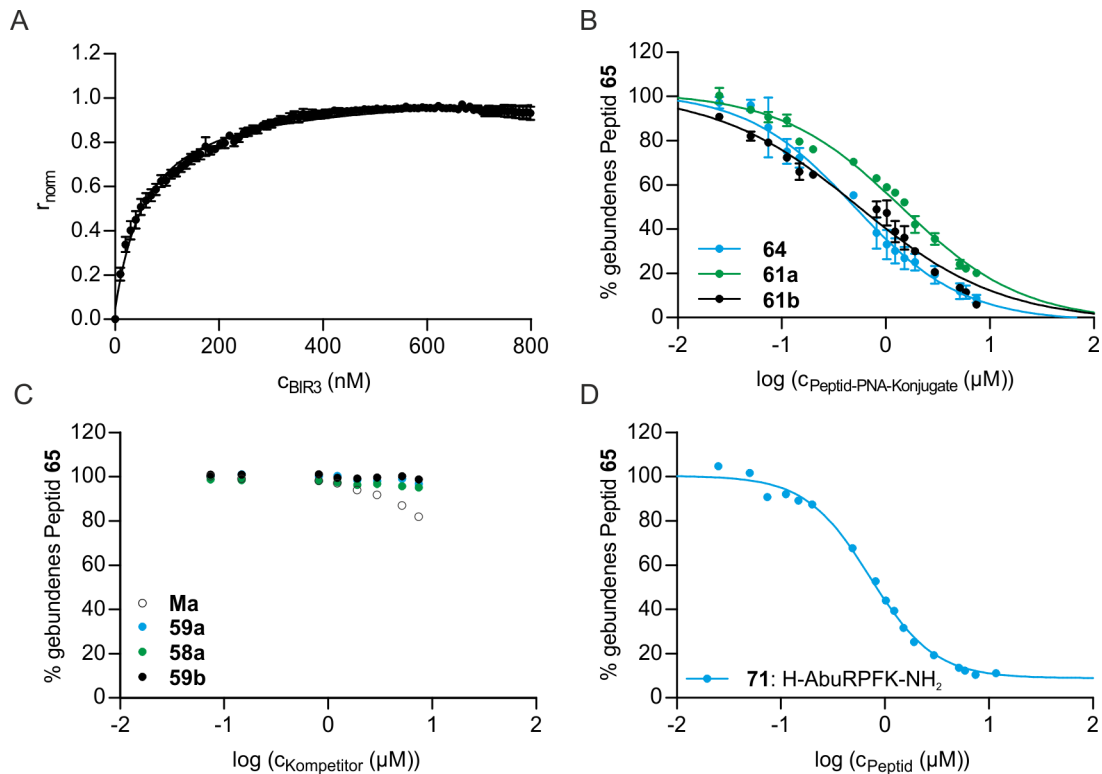


Abbildung 32: A) K_D -Bestimmung durch Fluoreszenzanisotropiemessungen während der Titration des Referenzpeptids **65** mit BIR3-Protein (Mittelwerte aus 6 Messungen mit Standardfehler). Bedingungen: 5 nM **65** in 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM Spermin, 0.2 mM TCEP, pH 7.5 wurden mit steigenden Konzentrationen von BIR3 titriert. IC₅₀-Messungen für B) die Transferprodukte **61a** und **61b**, sowie Smac-PNA-Konjugat **64** (Mittelwerte aus 2 Messungen mit Standardfehler), C) die Transferprodukte **58a**, **59a** und **59b** sowie DNA-Templat **Ma** und D) Peptid **71**. Bedingungen: 5 nM **65** und 230 nM BIR3 in 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM Spermin, 0.2 mM TCEP, 0.1 mg/mL BSA, pH 7.5 wurden mit steigenden Konzentrationen von **Ma**, **58a**, **59a**, **59b**, **61a**, **61b** und **64** sowie **71** (0 μM – 7.4 μM) titriert.

Tabelle 4: Überblick über die ermittelten IC₅₀-Werte für die Peptid-PNA-Konjugate **64**, **61a** und **61b**.

		IC ₅₀ (μM)
H-AVPIAQK-cctacag-G-NH ₂	64	0.54
H-AVPI _{acea} -cctacag-G-NH ₂	61b	0.56
H-ACPIAQK-cctacag-G-NH ₂	61a	1.52

4.2 Transferreaktion in Gegenwart von BIR3

Die Peptid-PNA-Konjugate wurden so konstruiert, dass bei der Transferreaktion ein bioaktives Peptid entstehen kann. Die Aktivität ergibt sich aus der Eigenschaft des Peptids, ähnlich dem Smac-Peptid an die BIR3-Domäne von XIAP zu binden. Dementsprechend sollte es möglich sein, die Transferprodukte *in situ* in Anwesenheit eines Komplexes von Referenzpeptid **65** und BIR3 zu generieren und deren Entstehung durch eine zunehmende Verdrängung von **65** zu beobachten (Abbildung 33). Daher wurde die Transferreaktion im Folgenden in Anwesenheit eines Komplexes von **65** und BIR3 durchgeführt. Dazu wurden 5 nM **65** und 230 nM BIR3 vorgelegt, die Transferedukte **58a** und **59a** bzw. **58a** und **59b** zugegeben und die Fluoreszenzanisotropie gemessen. Dieser Wert entsprach 100% gebundenem Referenzpeptid **65**. Mit Zugabe des perfekt komplementären DNA-Templats **Ma** wurde der Transfer von Alanin von **58a** auf **59a** bzw. **59b** induziert und es wurde die Abnahme der Fluoreszenzanisotropie über die Zeit beobachtet. Bei vollständiger Verdrängung von **65** würde der Anisotropiewert für das freie Referenzpeptid in Puffer erreicht.

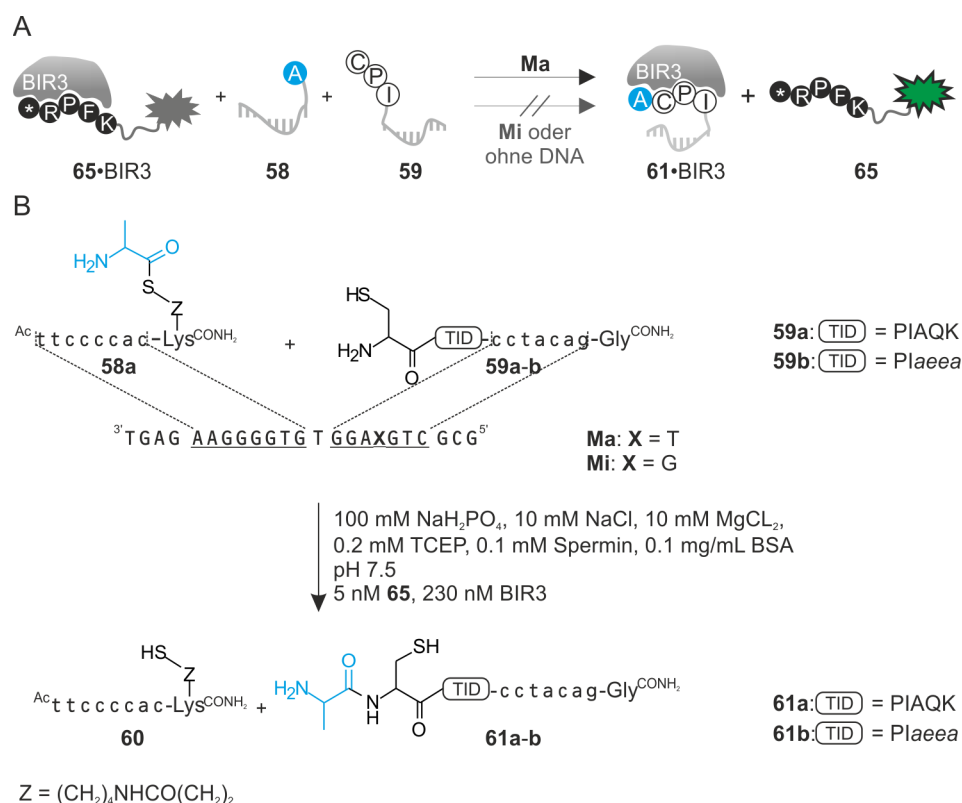


Abbildung 33: A) Schematische Darstellung der Kopplung von Transferreaktion und Fluoreszenzanisotropieassay. * = 2-Aminobuttersäure B) Schematische Darstellung des templatkontrollierten Transfers von Alanin in Gegenwart eines Komplexes aus **65** und BIR3.

Die Transferreaktionen zwischen **58a** und **59a** bzw. **58a** und **59b** wurden in An- und Abwesenheit des DNA-Templats **Ma** durchgeführt, in Anwesenheit des einzelbasenfehlpaarenden Templats **Mi** sowie in Anwesenheit von substöchiometrischen Konzentrationen von **Ma** untersucht. Für beide Transferreaktionen blieben in Abwesenheit von **Ma** nahezu 100% des Referenzpeptids **65** an BIR3 gebunden (Abbildung 34). Gleiches wurde bei Zugabe von **Mi** beobachtet. Ebenso wenig konnte **65** nur durch die Zugabe der DNA **Ma** allein verdrängt werden. Die Gegenwart von 1 Äq. komplementärer DNA **Ma** führte zur Bildung der Transferprodukte **61a** und **61b**. Daher wurden innerhalb von 30 min 45% von **65** verdrängt, wenn in Gegenwart von 1 Äq. DNA **Ma** 2 μ M des Nukleophils **59b** und 4 μ M des Thioesters **58a** eingesetzt wurden.

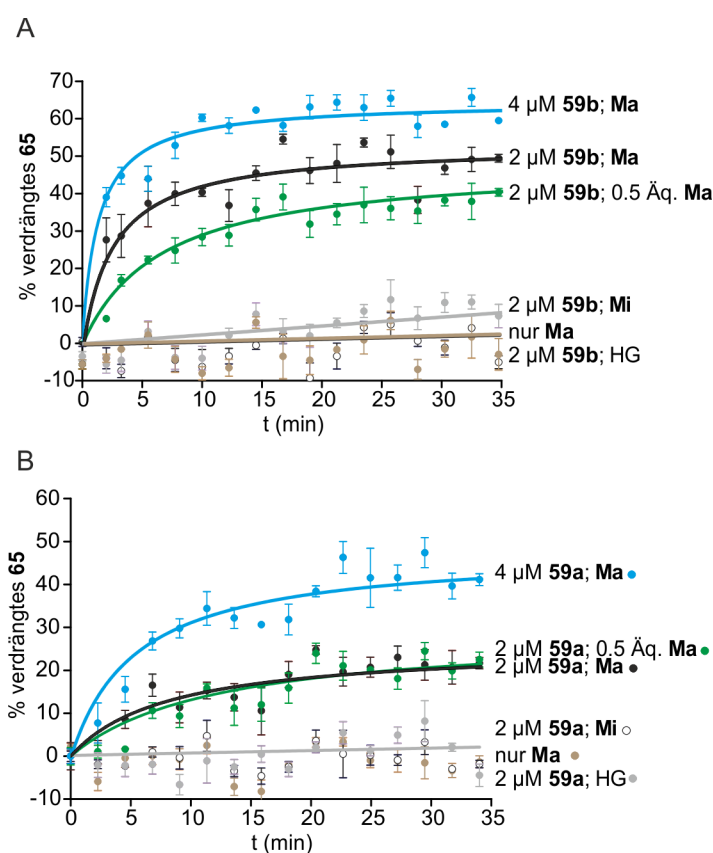


Abbildung 34: Verdrängung des Referenzpeptids **65** während der templatkatalysierten Transferreaktion in Gegenwart von BIR3-Protein. Bedingungen 5 nM **65** und 230 nM BIR3 in 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM TCEP, 0.1 mM Spermin, 0.1 mg/mL BSA, pH 7.5; Zugabe von A) **59b** bzw. B) **59a** mit einer Konzentration von 2 μ M – 4 μ M, 2 Äq. **58a** und 1 Äq. oder 0.5 Äq. **Ma** oder 1 Äq. **Mi** oder ohne DNA (HG). Dargestellt sind die normalisierten Mittelwerte aus drei Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

Interessanterweise konnten bei Verwendung einer substöchiometrischen Menge des Templats ($c(\mathbf{Ma}) = 1 \mu\text{M}$) 35% des Peptids **65** verdrängt werden. Damit ermöglichte das Templat einen katalytischen Umsatz der Reaktanten. Auch für die Reaktion zwischen **58a** und **59a** konnte in

Anwesenheit der DNA **Ma** mit der Zeit eine Verdrängung von **65** beobachtet werden. Diese ist allerdings nicht so stark wie für die Reaktion von **58a** und **59b**. So werden innerhalb von 30 min 20% von **65** verdrängt, wenn 2 μM **59a** und 4 μM des Donors **58a** in Gegenwart von 2 μM **Ma** umgesetzt werden. Der Einsatz von nur 0.5 Äq. DNA führte ebenfalls zu 20% Verdrängung von **65**. Steigende Konzentrationen der Peptid-PNA-Konjugate von 8 μM für **58a** und 4 μM von **59b** bzw. **59a** führten zur Bildung höherer Konzentrationen **61b** bzw. **61a** und damit zu 62% bzw. 40% Verdrängung von **65**. Eine weitere Erhöhung der Eduktkonzentrationen führt zu einer verstärkten Hintergrundreaktion sowie verringerter Selektivität der Reaktion (nicht gezeigt).

Für alle Reaktionen in Anwesenheit von DNA-Templat wurde nach ca. 15 – 20 min ein Plateau erreicht, nachdem keine Verdrängung des Referenzpeptids mehr beobachtet wurde. Allerdings ließen die Untersuchungen der Reaktionskinetiken für die Transferreaktionen während der Diplomarbeit sowie die ermittelten IC_{50} -Werte der Transferprodukte **61a** und **61b** in Kapitel 4.1.4 eine stärkere Verdrängung erwarten. Daher wurde der Reaktionsverlauf für die Transferreaktion von **58a** und **59a** in Anwesenheit von **Ma** im Assaypuffer auch HPLC-chromatografisch verfolgt und die Entstehung von **61a** über die Zeit beobachtet (siehe Anhang 8.1). In Abbildung 35A wird ersichtlich, dass sich die zeitliche Entwicklung der Reaktion in Phosphatpuffer (10 mM NaH_2PO_4 , 200 mM NaCl, 0.2 mM TCEP, pH 7.0) und im Assaypuffer kaum unterscheidet. Nach 30 min Reaktionszeit wurden in beiden Fällen 80% **61a** gebildet. Damit sollte bei einer Ausgangskonzentration von 1 μM **58a** eine ca. 0.8 μM Konzentration an **61a** vorliegen. Bei einem IC_{50} von 1.52 μM wäre eine Verdrängung des Referenzpeptids **65** von ca. 40% zu erwarten. Bei Verfolgung der Transferreaktion über die Änderung der Anisotropie des Referenzpeptids konnten aber nur ca. 20% von **65** verdrängt werden, obwohl höhere Konzentrationen der Edukte eingesetzt wurden. Aus den Untersuchungen in Kapitel 4.1.4 lässt sich auch schließen, dass das verbleibende gebundene Referenzpeptid nicht auf eine unspezifische Bindung zurückzuführen ist, da diese nur ca. 10% der Gesamtbindung ausmacht. Mit einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob das bei der templatkatalysierten Transferreaktion gebildete Transferprodukt das Referenzpeptid dennoch vollständig von BIR3 verdrängen kann. Dazu wurden 10 μM **59a** und 2 Äq. **58a** in Anwesenheit von 5 nM Referenzpeptid **65** und 50 nM BIR3 jeweils mit oder ohne 1 Äq. **Ma** zur Reaktion gebracht (Abbildung 35B). Dabei war das Referenzpeptid **65** bei der vorliegenden Proteinkonzentration auch zu Beginn der Reaktion nicht mehr zu 100% gebunden (siehe auch Anhang 8.2, Abbildung 68). Innerhalb von 20 min entstand dann so viel Transferprodukt **61a**, dass ca. 85% des Referenzpeptids **65** (Verdrängung 45% auf 7%) vom vorhandenen BIR3-

Protein verdrängt wurden. Nach dieser Zeit wurde ein Plateau erreicht und es wurde kein weiteres Absinken der Anisotropie beobachtet.

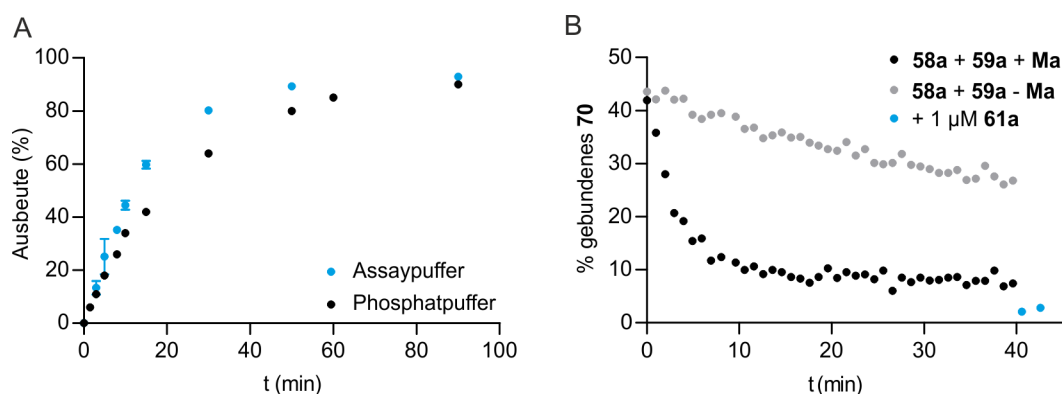


Abbildung 35: A) Reaktionsverlauf der Transferreaktion von **58a** und **59a** in Anwesenheit von komplementärer DNA **Ma**. Bedingungen: blau: c_{58a} : 1 μM ; c_{59a} : 2 μM in 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 0.1 mM Spermin, 0.1 mg/mL BSA, 10 mM MgCl_2 , 0.2 mM TCEP, pH 7.5; schwarz: c_{58a} : 0.75 μM ; c_{59a} : 1.5 μM in 10 mM NaH_2PO_4 , 200 mM NaCl, 0.2 mM TCEP, pH 7.0. B) Anisotropiemessungen zur Transferreaktion. Bedingungen: 5 nM **65** und 50 nM BIR3 in 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 0.1 mM Spermin, 0.1 mg/mL BSA, 10 mM MgCl_2 , 0.2 mM TCEP, pH 7.5. Zugabe von **59a** in 10 μM Endkonzentration und 2 Äq. **58a** sowie mit und ohne 1 Äq. komplementäre DNA **Ma**.

Durch Zugabe des entsprechenden vorsynthetisierten Peptid-PNA-Konjugats **61a** konnte das Referenzpeptid allerdings noch weiter verdrängt werden (Abbildung 35B blau). Damit war auch in diesem Fall das *in situ* gebildete Transferprodukt nicht in der Lage, das Referenzpeptid vollständig zu verdrängen bzw. wurde nicht genug Transferprodukt generiert, um dies zu erreichen. Zudem lieferte die Hintergrundreaktion in Abwesenheit von **Ma** ebenfalls Transferprodukt, da bei hohen Konzentrationen die Reaktion auch templatenabhängig verläuft.

Bei den Experimenten konnte das Referenzpeptid nicht in dem Maße vom BIR3-Protein verdrängt werden, wie es nach den IC_{50} -Messungen erwartet wurde. Nach ca. 15 – 20 min wurde jeweils ein Plateau erreicht, nachdem keine weitere Abnahme der Fluoreszenzanisotropie beobachtet wurde, d. h. das Referenzpeptid nicht weiter verdrängt wurde. Die Untersuchungen der Reaktionskinetik für die Reaktion von **58a** und **59a** zeigten aber, dass auch im Assaypuffer nach dieser Zeit noch Transferprodukt generiert wird. Dies würde bedeuten, dass die Reaktion durch die Gegenwart des BIR3-Proteins nach dieser Zeit, d. h. wenn sich die Eduktkonzentrationen verringert haben, stark verlangsamt wird. Eine weitere Möglichkeit ist, dass ein Anteil der Eduktkonjugate bzw. des DNA-Templats unspezifisch mit dem Protein wechselwirken und damit für die Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen. Dafür spricht auch, dass durch die zusätzliche Zugabe der Transferprodukte nach beendeter Reaktion weiteres Referenzpeptid verdrängt wer-

den kann. Diese unspezifische Bindung wäre auch durch die in Kapitel 4.1.4 durchgeführten Kompetitionsexperimente nicht direkt messbar gewesen.

4.3 Stabilität der Peptid-PNA-Konjugate

Ein Nachteil von Peptid-basierten Wirkstoffen ist deren geringe *in vivo* Lebensdauer. Es wurde aber gezeigt, dass der proteolytische Peptidabbau durch Acylierung, PEGylierung, den Einbau von unnatürlichen Aminosäuren oder die Einschränkung der Peptidkonformation verringert werden kann.^[138,139] Die Gruppe um Brock konnte zeigen, dass das 7mer Smac-Peptid AVPIAQK als Konjugat mit HPMA (Poly(hydroxypropyl-methacrylamid)-*co*-(Methacrylat-Gly-Gly-Nitrophenylester)) die Überlebensfähigkeit von HeLa-Zellen nach einem proapoptotischen Stimulus stärker herabsetzt als das Peptid allein. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Polymer den proteolytischen Abbau des Smac-Peptids verhindert.^[140] Auch die hier untersuchte Transferreaktion zur Generierung von apoptotischen Peptid-PNA-Konjugaten könnte intrazellulär Anwendung finden. Dafür sollten die Konjugate proteolytisch stabil sein. Im Weiteren wurde daher untersucht, inwieweit die Modifizierung der Smac-Peptide durch Anbringung der PNA-Oligomere die Stabilität der Konjugate in Zelllysats beeinflusst.

4.3.1 Synthese von FAM-markierten Smac-Peptiden und Peptid-PNA-Konjugaten

Für die Untersuchung der Stabilität der Peptide und Peptid-PNA-Konjugate in Zelllysats wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM (5,6-Carboxyfluorescein) markiert. Mittels Fluoreszenzdetektion können die Sequenzen selektiv auch vor dem Hintergrund intrazellulärer Biomoleküle nachgewiesen werden. So konnten die Peptide und deren PNA-Konjugate in Zelllysats inkubiert und deren Abbau HPLC-chromatografisch verfolgt werden.

Für die Experimente wurden zunächst die Transferprodukte **61a** und **61b** mit FAM markiert. Hierbei wurde FAM an die ϵ -Aminofunktion eines Lysinrestes gekuppelt. Das Transferprodukt **61a** enthält in der Peptidsequenz bereits ein Lysin, welches an der Bindung an die BIR3-Domäne von XIAP nicht beteiligt ist.^[129,141] Dieser Aminosäurerest kann daher für die Einführung des Fluoreszenzfarbstoffes in das Peptid-PNA-Konjugat genutzt werden, wodurch das markierte Konjugat **76b** erhalten wird (Abbildung 36, Tabelle 5). Weiterhin wurden die C-terminal FAM-markierten Transferprodukte **76a** und **81** synthetisiert (Tabelle 5). Ein Syntheschema für die Generierung der FAM-markierten Konjugate ist in Abbildung 36 anhand der Synthese von **76a** und **76b** gezeigt. Für den Aufbau dieser Konjugate wurde zunächst ein Rinkamid-Harz mit Fmoc-geschütztem Lysin(Alloc) bzw. Lysin(Boc) beladen und dann die PNA-Sequenz in **73**,

schließlich die Aminosäuresequenz zu **74** aufgebaut. Die orthogonale Alloc-Schutzgruppe wurde mittels $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ abgespalten, wobei die ϵ -Aminofunktion eines Lysinrestes freigesetzt wurde. Anschließend wurde FAM gekuppelt. Die Freisetzung der Fmoc-geschützten Peptid-PNA-Sequenzen **75** erfolgte durch Behandlung der Harze mit TFA (Abbildung 36).

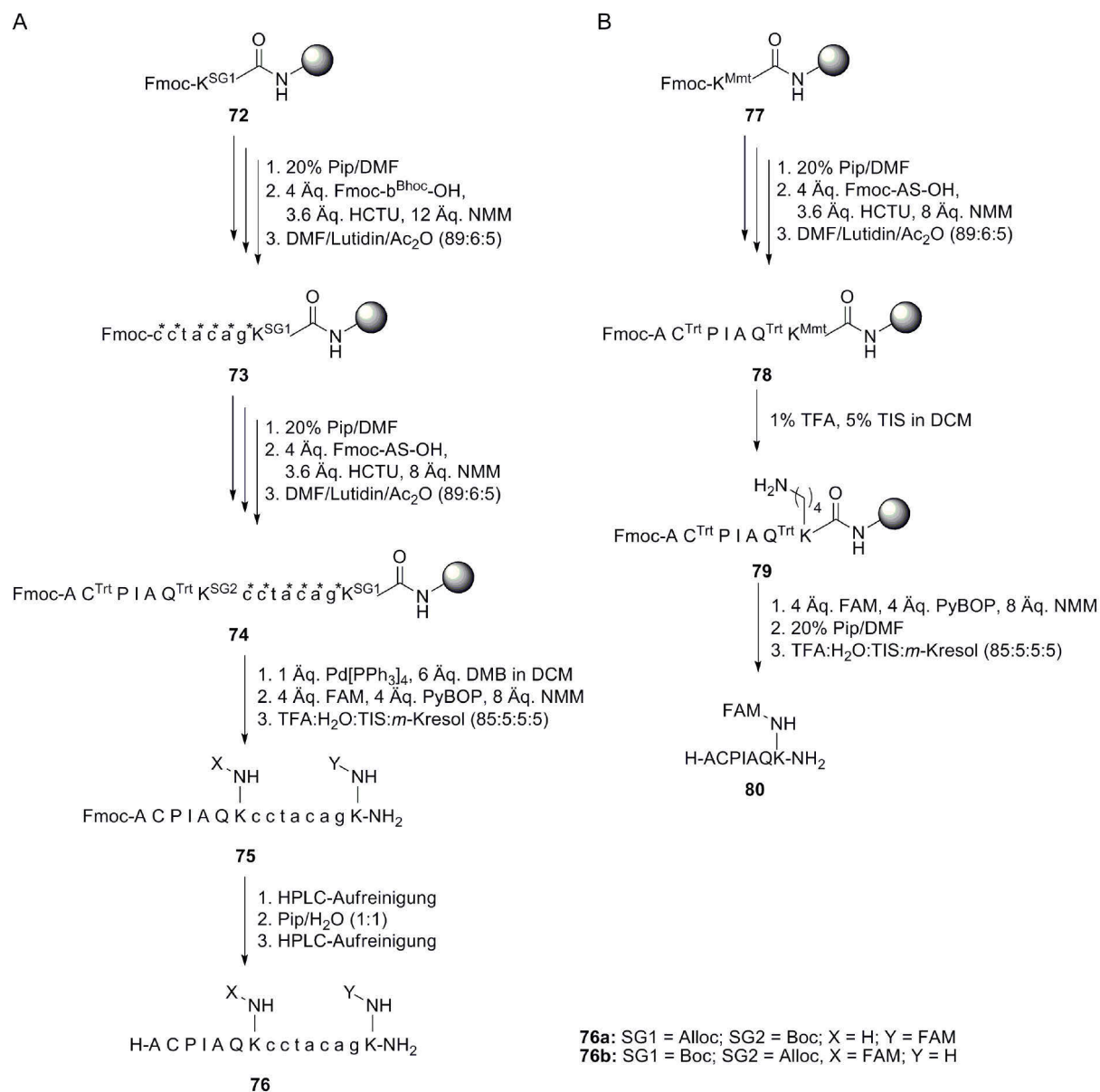


Abbildung 36: A) Synthese der FAM-markierten Peptid-PNA-Konjugate am Beispiel von **76a** und **76b**; DMB = Dimethylbarbitursäure, * = Bhoc-Schutzgruppe. B) Synthese des FAM-markierten Peptids **80**.

Die N-terminale Fmoc-Gruppe diente dabei als hydrophobe Markierung, die die chromatographische Aufreinigung der Peptid-PNA-Konjugate erleichterte. Es wurden zunächst die Fmoc-geschützte Peptid-PNA-Sequenzen **75a** und **75b** mittels präparativer HPLC aufgereinigt und

anschließend die Fmoc-Schutzgruppe vom getrockneten Produkt mit Piperidin:Wasser (1:1) abgespalten und die entschützten Sequenzen **76a** und **76b** erneut aufgereinigt. Außerdem wurde das fluoreszenzmarkierte Peptid **80** an einem Fmoc-Lys(Mmt) beladenen Rinkamid-Harz aufgebaut. Nach der Synthese der Aminosäuresequenz wurde die Mmt-Schutzgruppe durch Behandlung mit 1% TFA in DCM abgespalten und an die freie ε -Aminogruppe des Lysins in **79** wurde FAM gekuppelt. Nach Abspalten der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe und der Freisetzung vom Harz erfolgte die HPLC-chromatografische Aufreinigung des FAM-markierten Peptids. In Tabelle 5 sind die synthetisierten Sequenzen und Ausbeuten der FAM-markierten Peptide und Peptid-PNA-Konjugate zusammengestellt.

Tabelle 5: Übersicht über die FAM-markierten Peptide und Peptid-PNA-Konjugate **76a**, **76b**, **80** und **81**.

Peptid-PNA-Konjugat	Sequenz	Ausbeute (%)
76a	H-ACPIAQK-cctacag-K(FAM)-NH ₂	3.3
76b	H-ACPIAQK(FAM)-cctacag-K-NH ₂	14.7
80	H-ACPIAQK(FAM)-NH ₂	3.4
81	H-ACPI _{aaaa} -cctacag-K(FAM)-NH ₂	4.3

4.3.2 Untersuchung der Stabilität in Zelllysate

Die Stabilität des markierten Peptids **80** und der PNA-Konjugate **76a**, **76b** und **81** wurde in HeLa-Zelllysate untersucht. Dazu wurden HeLa-Zellen in DMEM-Medium bis zu 90% Konfluenz kultiviert, anschließend geerntet und lysiert. Membranfragmente wurden durch Ultrazentrifugation pelletiert und das überstehende Zelllysate für die Stabilitätsexperimente verwendet oder bei -80 °C aufbewahrt. Zu 500 μ L Zelllysate wurden **76a**, **76b**, **80** und **81** so zugegeben, dass eine Endkonzentration von 2 μ M für die Konjugate erhalten wurde und diese bei 25 °C inkubiert. Zur Analyse wurden zu verschiedenen Zeiten Aliquots von 100 μ L entnommen, mit 2 μ L TFA versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Vor der HPLC-Analytik wurden die Aliquots aufgetaut und mittels Sepac gereinigt (60% ACN, 0.1% TFA in Wasser). Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden lyophilisiert, in 100 μ L Wasser aufgenommen und HPLC-chromatografisch analysiert. Hierbei wurden die FAM-markierten Fragmente fluoreszenzspektrometrisch (λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 530 nm) detektiert. Für **80** erfolgte zusätzlich eine Inkubation in Puffer ohne Zellbestandteile. Die Probenvorbereitung erfolgte trotzdem analog der Experimente im Lysat. Die

für **80** erhaltenen HPLC-Chromatogramme zu Beginn und nach der Inkubationszeit sind in Abbildung 37 dargestellt. Die Chromatogramme zeigen, dass im Kontrollexperiment ohne Zelllysate kein Abbau des Peptids stattfindet (Abbildung 37A). Die Untersuchung in Zelllysate führte dagegen bereits nach 1 h zu einem kompletten Abbau des Peptids (Abbildung 37B).

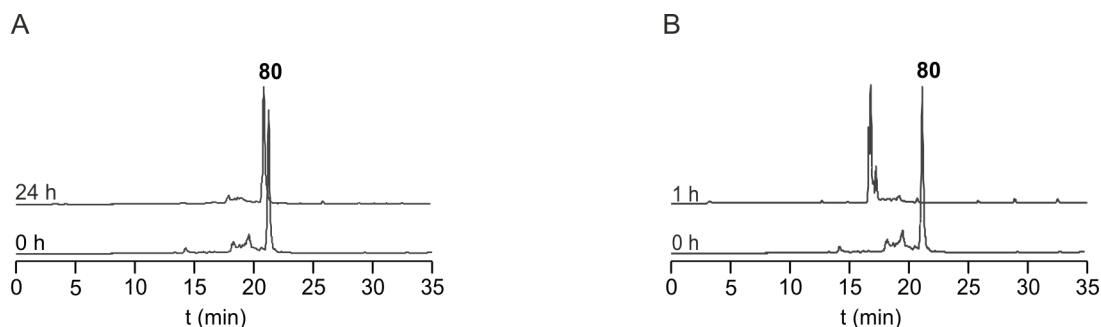


Abbildung 37: HPLC-Chromatogramme ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$) von **80** nach verschiedenen Inkubationszeiten in A) PBS-Puffer und B) HeLa-Zelllysate (Gradient 5).

Dagegen konnte für das entsprechende Peptid-PNA-Konjugat **76b** eine verlängerte Lebensdauer im Zelllysate beobachtet werden. Konjugat **76b** erscheint aufgrund des 5-/6-FAM-Isomers im Chromatogramm als Doppelpeak bei 16.9 min (Abbildung 38A). Mit der Zeit erscheint ein neuer fluoreszierender Peak bei 14.4 min. Durch Integration und Vergleich der Peakflächen wurde festgestellt, dass nach 3 h immer noch 60% von **76b** vorhanden waren. Der Abbau der Konjugate wurde also durch die PNA-Oligomere gegenüber dem freien Peptid verlangsamt. Mittels MALDI-Analyse konnte die Identität des neu entstandenen Peaks aufgeklärt werden. Demnach erscheint ein zusätzliches Signal bei m/z 2496 (Abbildung 38B). Diese Masse entspricht dem Abbauprodukt **82** (Abbildung 39A), bei dem das Peptid bis zur FAM-Modifikation abgebaut wurde. Das Konjugat **76a** zeigte eine vergleichbare Stabilität. Nach 4 h waren noch ca. 80% von **76a** vorhanden (Chromatogramme siehe Anhang 8.3, Abbildung 69). Eine MALDI-Analytik gelang in diesem Fall nicht. Es wird aber vermutet, dass die stabile Abbruchsequenz **83** entsteht, bei dem das Peptid bis zur PNA-Sequenz abgebaut wurde (Abbildung 39B). Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Untersuchung des Abbaus von **81** unterstützt. Auch hier sind nach 3 h noch 80% des Konjugats im Chromatogramm nachzuweisen (Abbildung 38C). Mit der Zeit wird das Entstehen eines neuen Peaks beobachtet. Im MALDI-Spektrum geht dies mit dem Auftreten eines neuen Massepeaks von m/z 2368 einher (Abbildung 38D). Dieser Masse entspricht das Abbauprodukt **83**, in dem das Peptid und der *aeaa*-Linker bis zur PNA-Sequenz abgebaut wurden (Abbildung 39C). Allerdings führte wahrscheinlich die Probenvorbereitung für die HPLC-chromatografische Analytik zu einem Materialverlust in den Proben, wodurch mit einigen Proben

nur kleine Signale erhalten wurden. Es wurde dann das relative Verhältnis von abgebauten und intakten Konjugaten in jeder Probe bestimmt.

Abschließend konnte also für die untersuchten Peptid-PNA-Konjugate eine verlängerte Lebensdauer in Zelllysats gegenüber einem reinen Peptid wie **80** beobachtet werden.

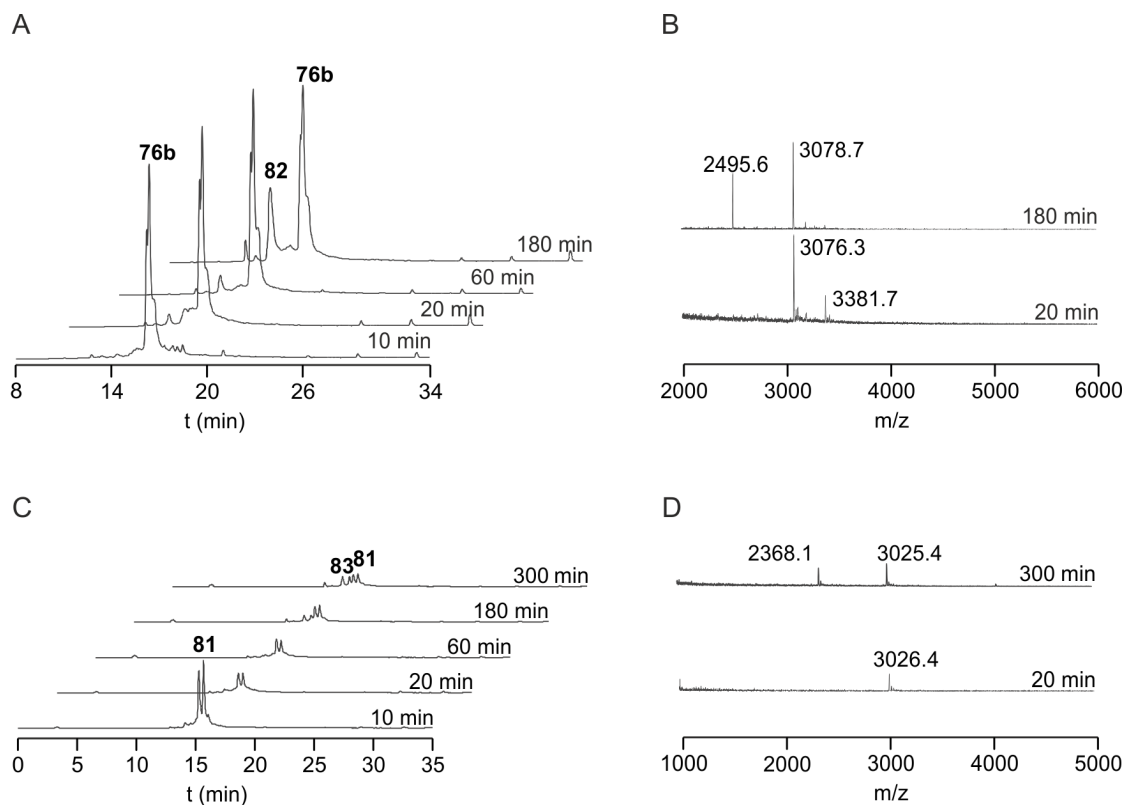


Abbildung 38: HPLC-Chromatogramme ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$) von A) **76b** und C) **81** nach verschiedenen Inkubationszeiten in HeLa-Zelllysats (Gradient 6) sowie MALDI/TOF-Spektren von B) **76b** und D) **81**.

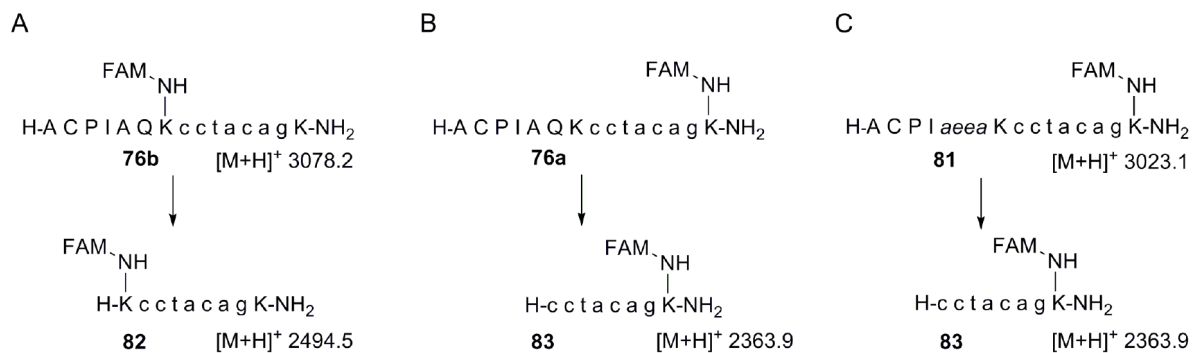


Abbildung 39: Bildung der Abbauprodukte **82** und **83** aus den Peptid-PNA-Konjugaten A) **76b**, B) **76a** und C) **81**.

Die Fluoreszenzmarkierung erlaubte die selektive Detektion der Hybride aus einem komplexen Reaktionsgemisch. Allerdings führte die Probenaufbereitung zur Vorbereitung für die HPLC-

chromatografische Analytik zu einem Materialverlust in den Proben. Für weitere Untersuchungen könnte eine alternative Methode nach Ruttekkolk *et al.* angewendet werden, bei der die Stabilität von Peptiden und Peptid-Polymer-Konjugaten in Zelllysats mittels Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) untersucht wird.^[142]

4.3.3 Smac-Peptide mit D-Aminosäuren

Da D-Aminosäuren keine Substrate von Proteasen sind, könnte der Austausch von einigen oder allen Aminosäuren in den Smac-Peptid-PNA-Konjugaten gegen die D-Enantiomere die Stabilität der Konjugate in biologischen Medien weiter erhöhen. Über D-Analoga von Smac-Peptiden gibt es bisher nur eine Untersuchung. In ihrer Studie testeten Hossbach *et al.* die Effizienz von D-Aminosäuren enthaltenden kurzen Smac-Peptiden sowie reversen Smac-Sequenzen mit Hilfe von Computermodellen und Zellexperimenten.^[143] Den Berechnungen zufolge zeigten die Peptide **H1** – **H3** (Tabelle 6) gegenüber der natürlichen Sequenz AVPI eine verbesserte Bindung an die BIR3-Domäne von XIAP. Allerdings konnte in Zellexperimenten mit den XIAP überexprimierenden Hodgkin Lymphoma Zelllinien L1236 und L248 nur für **H1** eine verstärkte Apoptose beobachtet werden. Quantitative Bindungsstudien wurden in den Untersuchungen nicht vorgenommen. Im Folgenden wurde daher mit Hilfe des Fluoreszenzanisotropieassays die Affinität von D-Analogen von Smac-Peptiden (**84** – **86**) untersucht. Da die Peptide auch für die Transferreaktion geeignet sein sollten, wurde zusätzlich eine Aminosäure in den von Hossbach *et al.* untersuchten Peptiden durch D- oder L-Cystein ersetzt. Der Austausch erfolgte nur, wenn aus den Computermodellen hervorging, dass die entsprechende Aminosäure nicht oder nicht essentiell mit der BIR3-Domäne wechselwirkt. Der Fmoc-Strategie folgend wurden die Peptide **84** – **86** am Peptidsyntheseautomaten an einem mit Glycin beladenen Rinkamid-Harz aufgebaut.

Tabelle 6: Peptidsequenzen der in der Untersuchung von Hossbach *et al.*^[143] verwendeten Smac-Peptide **H1** – **H3** und der dort ermittelte Anteil an apoptotischen Zellen, sowie Sequenzen der für die Bindungsuntersuchungen verwendeten Cys-Peptide **84** – **86**.

Peptid und Apoptose (%) nach Hossbach <i>et al.</i> *			abgeleitete Cys-Peptide für die Bindungsuntersuchung	
H1	avPf	64	acPfG	84
H2	fPVA	30	fCVAG	85
H3	fPva	26	fCvaG	86

* Zur besseren Übersicht werden D-Aminosäuren in dieser Tabelle durch kleine Buchstaben, L-Aminosäuren durch große Buchstaben symbolisiert

Die C-terminale Modifikation mit Glycin simuliert dabei den Einfluss einer nicht chiralen C-terminalen Modifizierung auf die Peptidkonformation. Es wurde ein Komplex von 5 nM Referenzpeptid **65** und 230 nM BIR3 mit steigenden Konzentrationen von **84** - **86** titriert. Allerdings zeigten die D-Analogen Peptide **84** - **86** keine Affinität zu BIR3 und konnten das Referenzpeptid nicht vom Protein verdrängen (Abbildung 40).

Der Einbau von unnatürlichen D-Aminosäuren in Smac-Analoga führte zu einem Verlust der Bindungsaffinität der Peptide zur BIR3-Domäne. Das von Hossbach *et al.*^[143] beobachtete erhöhte Zellsterben in Gegenwart der D-Analoga, könnte demnach auf einem anderen Wirkmechanismus als der Bindung der Peptide an XIAP beruhen. Andererseits wurde hier durch Anbringung des C-terminalen Glycins eine weitere Modifikation vorgenommen und die Peptide sind nicht direkt vergleichbar mit den von Hossbach *et al.* untersuchten Molekülen. Da für die hier durchgeführten Untersuchungen eine solche Abwandlung der Peptide hin zu Peptid-PNA-Konjugaten nötig wäre, stellten die D-analogen Smac-Peptide allerdings keine Alternative für weitere Versuche dar.

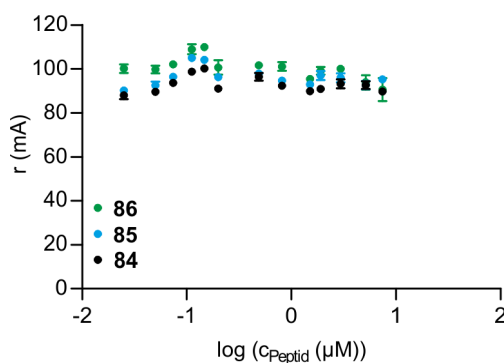


Abbildung 40: IC₅₀-Messungen für die Verdrängung von **65** mit **84** - **86**. Bedingungen: 5 nM **65** und 230 nM BIR3 in 100 mM NaH₂PO₄, 0.2 mM TCEP, 0.1 mg/mL BSA, pH 7.5 wurden mit steigenden Konzentrationen von **84** - **86** versetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

4.4 Caspase-Assay

In den bisher beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der templatkatalysierte Transfer einer Aminosäure Peptid-PNA-Konjugate generiert, die an die BIR3-Domäne von XIAP binden. Die Transferreaktion konnte in einen homogenen *in vitro* Bindungsassay integriert werden, wobei die *in situ* generierten Transferprodukte ein Referenzpeptid vom BIR3-Protein verdrängten. Dabei kann die Verdrängung als Modell für die Initiation der Apoptose über den intrinsischen Signalweg angesehen werden. In gesunden Zellen aktiviert das Smac-Protein nach einem proapoptotischen Stimulus die Caspase-9, indem es ebenso wie diese an die BIR3-Domäne

von XIAP bindet, die Caspase-9 verdrängt und damit aktiviert (Abbildung 17 und Abbildung 18). Es sollte daher möglich sein, dass die *in situ* gebildeten Transferprodukte die Caspase-9 von XIAP verdrängen und diese damit aktivieren. Um dies zu untersuchen wurde im Folgenden ein Caspase-Assay entwickelt (Abbildung 41).

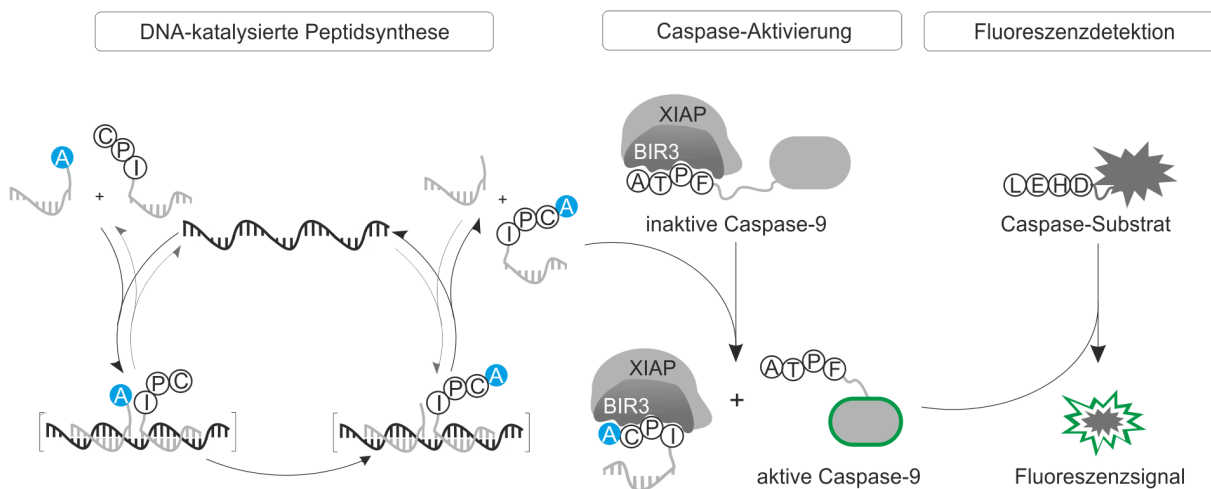


Abbildung 41: Schematische Darstellung des Caspase-Assays.

Dabei bindet zunächst die BIR3-Domäne von XIAP die Caspase-9, die dadurch inhibiert wird. Werden in einer vorgelagerten templatkatalysierten Transferreaktion die Smac-mimetischen Transferprodukte **61a** und **61b** gebildet, so können diese an BIR3 binden und die Caspase-9 verdrängen. Damit kann die aktive Caspase-9 ein spezifisches fluorogenes Substrat schneiden. Bei Aktivierung der Caspase-9 durch die generierten Peptid-PNA-Konjugate wird also ein Ansteigen des Fluoreszenzsignals beobachtet.

4.4.1 Caspase-Assay mit Kit

Die Firma *BioVision* stellt für die Untersuchung der Caspase-9-Aktivität ein *Caspase-9 Inhibitor Drug Screening Kit* zur Verfügung. Dieses wird verwendet, um Caspase-9 Inhibitoren zu identifizieren. In der Ausstattung werden rekombinante, aktive Caspase-9, das fluorogene Caspase-9 spezifische Substrat Ac-LEHD-AFC **87** sowie der Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK **90** (Abbildung 42) und ein Reaktionspuffer bereitgestellt. Dabei setzt die aktive Caspase-9 aus dem synthetischen Substrat **87** den Fluorophor AFC (7-Amino-4-(trifluoromethyl)coumarin) (**88**) frei, der fluoreszenzspektrometrisch detektiert werden kann. Zur Identifizierung von Caspase-Inhibitoren können die zu untersuchenden Verbindungen in die Reaktionslösung gegeben werden und die Stärke der Inhibierung wird über den Vergleich der Fluoreszenzintensität in An- und Abwesenheit des Inhibitors bestimmt.

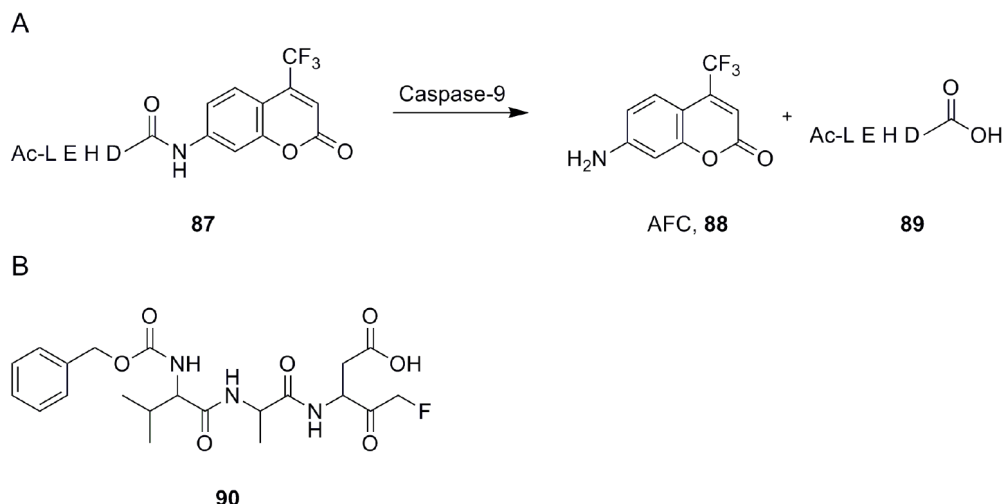


Abbildung 42: A) Freisetzung von fluoreszierendem AFC (**88**) aus dem Caspase-9 spezifischen Substrat Ac-LEHD-AFC **87**.
B) Struktur des Caspase Inhibitors Z-VAD-FMK **90**.

Anpassung des Assay-Protokolls

Zunächst musste das Assay-Protokoll, welches von *BioVision* vorgeschlagen wurde, angepasst werden. Caspasen sind Cystein-Proteasen und benötigen für eine volle Aktivität die Anwesenheit von DTT als Reduktionsmittel. Daher wird für den Caspase-Assay eine 1 M DTT-Lösung bereitgestellt, die mit dem Reaktionspuffer gemischt wird, so dass eine Endkonzentration für DTT von 10 mM erhalten wird. Das Reduktionsmittel würde aber durch Thiolyse des Edukts **58a** die Transferreaktion stören. Daher wurde untersucht, ob DTT im Caspase-Assay durch TCEP ersetzt werden kann. Die Caspase-Aktivität wurde in Anwesenheit von 10 mM DTT oder 0.2 mM TCEP jeweils mit und ohne den Inhibitor **90** (Endkonzentration 20 μ M) gemessen. Zur Kontrolle wurden auch beide Puffer in Abwesenheit der Caspase-9 mit dem Substrat versetzt. Die Messungen erfolgten bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 380$ nm und Auslesungswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 485$ nm. Abbildung 43A zeigt, dass in Abwesenheit von Caspase-9 und in Anwesenheit des Inhibitors **90** die Fluoreszenzintensität über die Zeit nicht zunimmt. Dagegen ist ein starker Anstieg zu beobachten, wenn Caspase-9 allein in Puffer vorliegt, d. h. die Caspase-9 ist in beiden Puffern aktiv und schneidet das Substrat **87**. Dabei unterscheidet sich der Fluoreszenzanstieg in beiden untersuchten Pufferlösungen nicht. Damit ist eine Konzentration von 0.2 mM TCEP im Reaktionspuffer ausreichend, um eine vergleichbare Aktivität der Caspase-9 wie im DTT-Puffer zu erhalten. In Abbildung 43A ist auch zu erkennen, dass für die Freisetzung von AFC (**88**) bereits nach kurzer Zeit das Detektorlimit erreicht wurde. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob sich die Konzentrationen des Substrats und auch der Caspase-9 verringern lassen (Abbildung

43B). Für das Experiment wurden nur noch 20% von **87** eingesetzt, so dass eine Endkonzentration von 10 μM **87** erhalten wurde. Des Weiteren wurde die Freisetzung von AFC (**88**) bei verschiedenen Enzymeinheiten untersucht. Trotz Verringerung der Substratkonzentration wurden sowohl mit 1 U als auch mit 0.5 U und 0.25 U Caspase-9 gute Signalintensitäten erhalten. Eine weitere Verminderung der Caspase-9-Konzentration führte zu einer starken Abnahme der Fluoreszenzintensität und der dynamische Bereich wurde zu klein. Alle weiteren Experimente wurden daher mit einer Substratkonzentration von 10 μM **87** und mit 0.5 U Caspase-9 durchgeführt. Außerdem wurde das Volumen für alle Reagenzien halbiert.

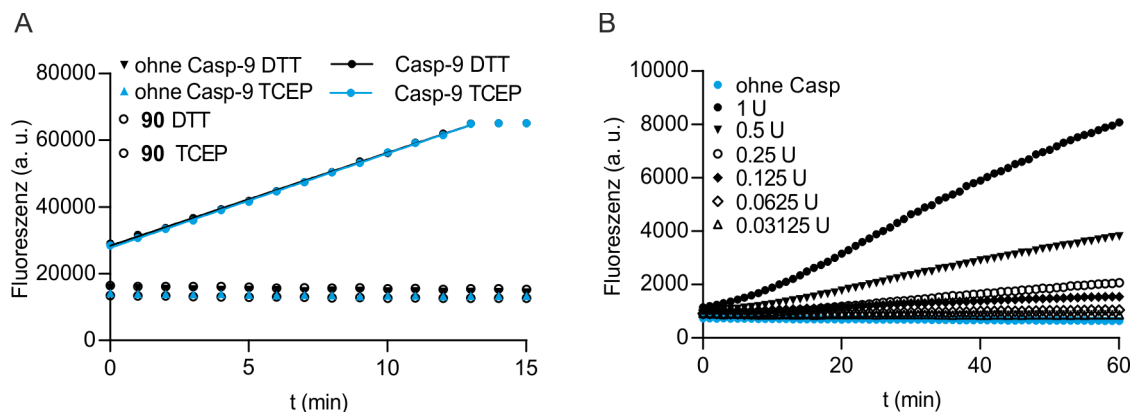


Abbildung 43: Zeitverläufe der Freisetzung von AFC (**88**) aus dem Caspase-9 Substrat **87** A) in DTT und TCEP enthaltenen Pufferlösungen und B) in Anwesenheit unterschiedlicher Enzymeinheiten. Bedingungen: A) zu 40 μM **90** in 50 μL H_2O oder nur 50 μL H_2O wurden 1 U Caspase-9 (0.5 μL , wenn zugegeben) pipettiert und 30 min bei 37 $^\circ\text{C}$ inkubiert; 50 μM **87** in 50 μL Reaktionspuffer mit 10 mM DTT oder 0.2 mM TCEP wurden zugegeben (Endvolumen 105 μL); B) zu 50 μL H_2O wurden 0.031 U - 1 U Caspase-9 pipettiert und 30 min bei 37 $^\circ\text{C}$ inkubiert; 20 μM **87** in 50 μL Reaktionspuffer mit 0.2 mM TCEP wurden zugegeben (Endvolumen 105 μL); $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$.

Inhibierung der Caspase-9 mit BIR3-Protein

Um zu überprüfen, ob das rekombinante BIR3-Protein die Caspase-9 inhibieren kann, wurde das Enzym mit höheren Konzentrationen an BIR3 (0 – 272 μM Endkonzentration) titriert. In Abbildung 44 sind die Fluoreszenzanstiege als Maß für die Caspase-9-Aktivität gegen die Konzentration von BIR3 jeweils für 0.5 U und 0.25 U des Enzyms aufgetragen. Dabei nimmt die Aktivität der Caspase-9 in Anwesenheit von kleinen BIR3-Konzentrationen (8.5 μM – 34 μM) zu. Mit steigender BIR3-Konzentration ist eine Abnahme der Caspase-9-Aktivität zu beobachten. Dafür sind allerdings sehr hohe Konzentrationen an BIR3 nötig. Erst bei Zugabe von 100 μM – 150 μM BIR3 wird eine Verringerung der Caspase-Aktivität gegenüber dem reinen Lysat erkennbar. Eine vollständige Inhibierung wie mit **90** (Anstieg = 0) konnte nicht erreicht werden.

Sun *et al.* konnten bereits zeigen, dass Caspase-9 in Puffer durch BIR3 inhibiert werden kann.^[144] Daher war zu klären, warum die Caspase-9 aus dem *Caspase-9 Inhibitor Drug Screening Kit* von *Bio-Vision* auch mit 34fach höheren Konzentrationen an BIR3 nicht inhibiert werden konnte.

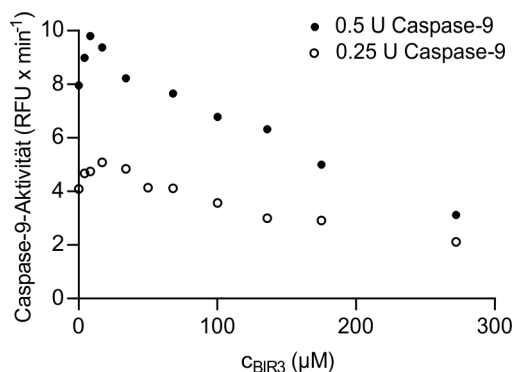


Abbildung 44: Titration von 0.5 U und 0.25 U Caspase-9 mit BIR3. Bedingungen: zu 0 μM – 272 μM BIR3 in 25 μL H_2O wurden 0.5 U oder 0.25 U Caspase-9 pipettiert und 30 min bei 37 °C inkubiert; 20 μM **87** in 25 μL Reaktionspuffer mit 0.2 mM TCEP wurden zugegeben (Endvolumen 55 μL); $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$.

Active Site Titration

Bei der Inhibierung der Caspase-9 durch XIAP handelt es sich um eine allosterische Enzymhemmung, bei der das enzymatisch aktive Zentrum nicht eingebunden ist.^[145] Die Inhibierung der Caspase-9 ist auf die Wechselwirkung der ATPF-Reste am N-Terminus der p12-Untereinheit der Caspase mit der BIR3-Domäne von XIAP zurückzuführen. Wahrscheinlich behindert diese Wechselwirkung den Eintritt des Substrates in das aktive Zentrum.^[124] Dies bedeutet aber auch, dass in dem verwendeten Assay BIR3 auch inaktives Enzym binden könnte. Damit würde ein großer Teil des zur Inhibierung zugegebenen BIR3 von Enzym gebunden, das überhaupt kein Substrat schneidet und damit auch kein Signal liefert.

BioVision gibt lediglich eine Enzymaktivität an, aber weder über die Konzentration an Caspase-9 noch über die Konzentration an aktiver Caspase-9 im Assay werden Angaben gemacht. Daher wurde zunächst mittels Bradford-Assay die Konzentration an Gesamtprotein bestimmt und anschließend mit Hilfe der *Active Site Titration* die Konzentration an aktivem Enzym abgeschätzt. Dazu wurde die Caspase-9 in Anwesenheit des Substrates **87** mit steigenden Konzentrationen des Inhibitor-Peptids **90** titriert. **90** bildet, im Gegensatz zu XIAP/BIR3, kovalente Bindungen mit den Aminosäureresten des aktiven Zentrums des Enzyms aus und inhibiert die Caspase damit irreversibel. Die Konzentration an **90**, die nötig ist, um die Caspase-Aktivität vollständig zu blockieren, entspricht dann der Konzentration an aktiver Caspase. Die Aktivität des Enzyms wird

gegen die Konzentration von Inhibitor **90** aufgetragen und die Konzentration an aktivem Enzym ergibt sich aus dem Schnittpunkt mit der X-Achse (Abbildung 45).^[146] Die Bestimmung des Gesamtproteins mittels Bradford ergab eine Konzentration von 160 $\mu\text{g/mL}$ Caspase-9. Bei einer Masse von ca. 46 kDa^[147] entspricht das einer Proteinkonzentration von 3.5 μM . Die Titration mit dem Inhibitorpeptid **90** ergab eine Konzentration an aktivem Enzym von ca. 0.3 μM . Damit sind nur ungefähr 10% des Enzyms aktiv und im Caspase-Assay werden ca. 90% des BIR3-Proteins von inaktivem Enzym gebunden.

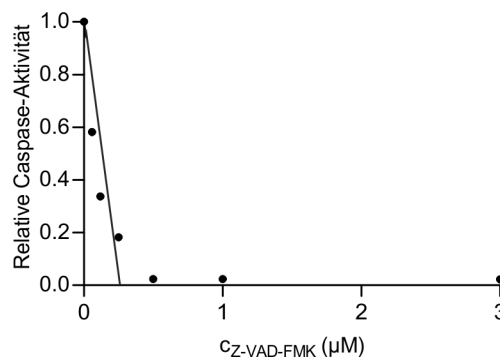


Abbildung 45: *Active Site Titration* zur ungefähren Bestimmung der Konzentration an aktiver Caspase-9. Bedingungen: zu 0 μM – 3 μM **90** in 25 μL H_2O wurden 0.5 U Caspase-9 pipettiert und 30 min bei 37 °C inkubiert; 20 μM **87** in 25 μL Reaktionspuffer mit 0.2 mM TCEP wurden zugegeben (Endvolumen 55 μL); $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$.

Aktivierung der Caspase-9 mit kosmotropen Salzen

Caspase-9 liegt als Initiatorcaspase im Zytoplasma in einer inaktiven, monomeren Form vor. Nach einem apoptotischen Stimulus wird das Protein an das Apoptosom, einen Proteinkomplex, der in Gegenwart von Cytochrom C und ATP/dATP gebildet wird, rekrutiert. Dort wird die Caspase-9 durch Dimerisierung aktiviert.^[147,148] Da diese cytosolischen Kofaktoren in einer Lösung rekombinanter Proteine nicht vorhanden sind, liegen rekombinante Initiatorcaspsen wie die Caspase-9 in einem Gemisch der inaktiven Monomerform und dem aktiven Dimer vor.^[149] Auch Stennicke *et al.* beobachteten, dass rekombinante Caspase-9 nur zu ca. 1 – 5% aktive Zentren aufwies.^[150] Pop *et al.* entwickelten ein Puffersystem, in dem die Aktivität von rekombinanten Caspasen mit Hilfe von kosmotropen Salzen gesteigert werden konnte.^[147,149,151] Kosmotrope Salze wie Citrate und verwandte organische Salze, Phosphate und Sulfate führen zu einer Stabilisierung von Proteinstrukturen in wässriger Umgebung. Pop *et al.* bemerkten, dass hochkonzentrierte kosmotrope Salze die Aktivität von Initiatorcaspsen auf zwei Weisen erhöhen: Einerseits wird die Dimerisierung der Monomere induziert und damit die Anzahl der aktiven Zentren in Lösung erhöht. Zweitens werden die Strukturen im aktiven Zentrum geordnet und die Substratbindung

unterstützt.^[149] Demnach ist Natriumcitrat das effektivste kosmotrope Salz für die Aktivierung von rekombinanten Initiatorcaspasen.

Um zu überprüfen, ob eine Aktivierung der kommerziellen Caspase-9 (*BioVision*) mittels Natriumcitrat möglich ist, wurde ein Protokoll von Pop *et al.* adaptiert. Die Gruppe konnte eine 100fache Steigerung der katalytischen Aktivität rekombinanter Caspase-9 beobachten, wenn diese zuvor in einem Citrat-Puffer (1 M Na-Citrat, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM DTT, 0.05% CHAPS, pH 7.4) bei 37 °C aktiviert wurde. Die Aktivierungszeit ist abhängig von der Aktivierungstemperatur und der Enzymkonzentration und muss jeweils optimiert werden. Als geeigneter Konzentrationsbereich für das Enzym werden 10 – 20 nM angegeben. Für die hier durchgeführten Experimente wurde der Puffer mit 0.2 mM TCEP anstelle von DTT verwendet und die rekombinante Caspase-9 (*BioVision*) auf Grundlage des Bradford-Assays darin so verdünnt, dass eine Endkonzentration von 20 nM und 40 nM Caspase-9 erhalten wurde. Die Konzentration an Na-Citrat betrug 1 M. Weiterhin wurde die Aktivität bei einer Substratkonzentration von 15 µM **87** gemessen und Aktivierungszeiten von 15 min – 5 h untersucht. Allerdings konnte bei den verwendeten Caspase-Konzentrationen keine Enzymaktivität beobachtet werden (nicht gezeigt). Daher wurden 0.5 U (1.75 µM), 0.25 U (0.88 µM) und 0.125 U (0.44 µM) der Caspase-9 in 1 M Citratpuffer gelöst und die Aktivität nach verschiedenen Aktivierungszeiten gemessen (Abbildung 46A).

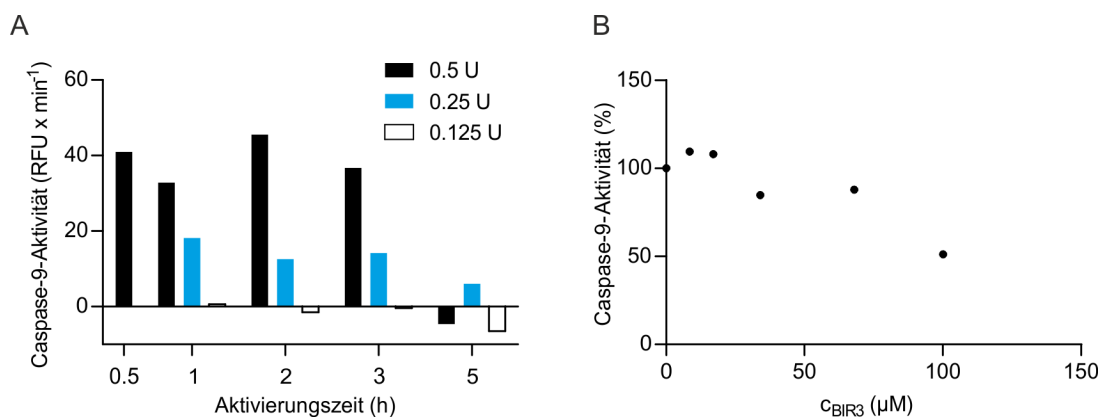


Abbildung 46: A) Caspase-9-Aktivität in Citratpuffer nach verschiedenen Aktivierungszeiten und für unterschiedliche Enzymeinheiten. Bedingungen: zu 25 µL Citratpuffer (1 M Na-Citrat, 50 mM NaH₂PO₄, 0.2 mM TCEP, 0.05% CHAPS, pH 7.4) wurden 5 µL Caspase-9 (0.125 U – 0.5 U) gegeben und bei 37 °C inkubiert (0.5 h – 5 h), 30 µM **87** in 25 µL Citratpuffer wurden zugegeben. B) Titration von 0.5 U Caspase-9 mit BIR3, mit 1.5 h Aktivierung in Citratpuffer. Bedingungen: zu 0 µM – 100 µM BIR3 in 25 µL Citratpuffer wurden 0.5 U Caspase-9 pipettiert und 1.5 h bei 37 °C inkubiert; 30 µM **87** in 25 µL Citratpuffer wurden zugegeben. (Endvolumen 52.5 µL); λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 485 nm.

Es zeigte sich, dass eine Aktivierungszeit von 0.5 – 3 h zu einer guten Aktivität für 0.5 U der Caspase-9 führt. 0.25 U des Enzyms führten zu einer geringeren Substratfreisetzung und 0.125 U

zeigten in allen Fällen keine messbare Enzymaktivität. Anschließend wurden im Citratpuffer 0.5 U Caspase-9 mit BIR3 (0 μ M – 100 μ M) versetzt und die Enzymaktivität untersucht, wobei eine Aktivierungszeit für die Caspase von 1.5 h gewählt wurde (Abbildung 46B). Es zeigte sich, dass in Gegenwart von 100 μ M BIR3-Protein ca. 50% der Caspase-9 inhibiert wurden, während zuvor nur eine Inhibierung von ca. 5 – 10% des Enzyms (Abbildung 44) erreicht wurde. Die Anwesenheit von Citrat führte zu einer erhöhten Konzentration an aktiver Caspase-9 im Reaktionsgemisch, deren Inaktivierung durch BIR3 durch den verringerten Substratumsatz erkennbar war.

Im weiteren Verlauf wurde versucht, die Inhibierung der Caspase-9 durch Zugabe von Transferprodukt **61a** aufzuheben, da dieses in der Lage sein sollte, an die BIR3-Domäne zu binden und damit die Caspase-9 zu verdrängen und zu aktivieren. Daher wurde ein Komplex von 0.5 U Caspase-9 und 100 μ M BIR3-Protein in 1 M Citratpuffer vorgelegt und die Caspase für 1.5 h aktiviert. Anschließend erfolgte die Titration des Komplexes mit steigenden Konzentrationen **61a**. Allerdings fiel das Peptid-PNA-Konjugat in dem hochkonzentrierten Citratpuffer aus. Die gewünschte Reaktivierung des Enzyms konnte daher nicht beobachtet werden und der Citratpuffer ist für die Durchführung der Transferreaktion mit den Peptid-PNA-Konjugaten nicht geeignet.

4.4.2 Caspase-Assay in Zelllysats

Mehrere Gruppen untersuchten die Aktivität von Caspasen in Zelllysats.^[133,152] Zellextrakte enthalten die funktionalen, zytosolischen Caspasen sowie deren Adaptermoleküle wie Apaf-1, welches zum Aufbau des Apoptosoms benötigt wird. Daher können apoptotische Signalwege wie sie nach der Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium eingeleitet werden, durch die Zugabe von Cytochrom C und ATP/dATP in Zelllysats rekonstruiert und abwärts stattfindende regulatorische Prozesse untersucht werden.^[153] Die zellfreien Extrakte lassen sich auch durch Zugabe oder Entzug der Komponenten des Apoptoseprogramms manipulieren. So untersuchten Nikolovska-Coleska *et al.* die Aktivität von Caspase-9 und Caspase-3 in Zelllysats von MDA-MB-231 Zellen, einer Brustkrebszelllinie.^[133] Die Inhibierung der Caspase-9 durch XIAP wurde durch Zugabe von rekombinantem BIR3-Protein simuliert. Dabei konnte die Caspase-Aktivität im Zelllysats durch BIR3 verringert werden. Die Aktivität wurde anschließend durch Zugabe von Smac-Mimetika wiederhergestellt. In einem analogen Assay müsste es möglich sein, Caspase-9 in Zelllysats mit BIR3 zu inhibieren und deren Aktivität durch die Peptid-PNA-Konjugate **61a** und **61b** zu rekonstruieren. Weiterhin wurde untersucht, ob die templatkatalysierte Peptidsynthese auch in der

Umgebung komplexer Biomakromoleküle erfolgen und damit der Wechselwirkung von XIAP und Caspase-9 entgegenwirken kann.

Gewinnung des Zelllysats

Es wurden Zellen der Linie HEK293 verwendet. Diese wurden in DMEM Medium (mit 1% Penicillin-Streptomycin und 10% Fetales Rinderserumalbumin) kultiviert. Bei Erreichen von 90% Konfluenz wurden die Zellen geerntet und in Puffer (20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM TCEP, pH 7.4) lysiert. Zellbestandteile wurden durch Ultrazentrifugation ($16000 \times g$ für 30 min bei 4 °C) pelletiert. In dem überstehenden Zelllysats wurde mittels Bradford Assay die Gesamtproteinkonzentration bestimmt und die erhaltenen Fraktionen sofort für die Messungen verwendet oder bei -80 °C aufbewahrt.

Untersuchung der Caspase-9-Aktivität in HEK293-Zelllysats

Zunächst wurde die Caspase-9-Aktivität in einer Verdünnungsreihe von Zelllysats mit Puffer bestimmt (Abbildung 47A). Dafür wurde in einer Mikrotiterplatte Zelllysats **L** (2 g/L Gesamtproteingehalt) mit Puffer (20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM TCEP, pH 7.4) in Anwesenheit von 10 μM CytC und 2 mM ATP verdünnt und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

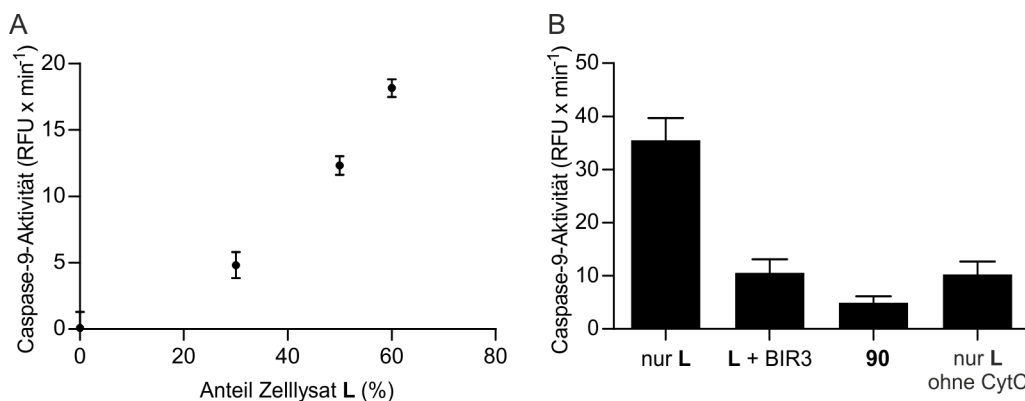


Abbildung 47: Caspase-9-Aktivität in Zelllysats **L** A) mit steigendem Anteil (0% – 60%) an Zelllysats **L** (Gesamtproteingehalt 2.2 g/L) in Puffer und B) bei Zugabe von 500 nM BIR3, 1 nM **90** oder in Abwesenheit von CytC. Bedingungen: A) 0% – 60% **L** wurde mit Puffer (20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM TCEP, 10 μM CytC, 2 mM ATP, pH 7.4) verdünnt (Endvolumen 25 μL) und bei 37 °C für 30 min inkubiert. 25 μL einer 100 μM Lösung von **87** in Puffer wurden zugegeben. (Endvolumen 50 μL); λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 485 nm. B) 30% **L** (Gesamtproteingehalt 5.3 g/L) wurden mit Puffer (s. A), mit und ohne CytC) verdünnt und 500 nM BIR3 oder 1 nM **90** zugegeben und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Rest wie A). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

Dabei erfolgte die Aktivierung der Caspase-9. Anschließend wurden die Lösungen jeweils mit **87** versetzt und die Fluoreszenzintensität gemessen. Wie bereits beschrieben (Kapitel 4.4.1) wird das Substrat **87** von der aktiven Caspase-9 geschnitten und AFC (**88**) freigesetzt. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität ist proportional zur Menge an aktiver Caspase-9 im Lysat. Wie in Abbildung 47 gezeigt, nahm der Fluoreszenzanstieg wie erwartet mit steigendem Anteil an Zelllysatz zu, da mit zunehmender Menge Lysat eine steigende Konzentration der Caspase-9 vorhanden sein sollte, die entsprechend mehr Substrat freisetzen kann. In Anwesenheit von 30% Lysat konnten bereits deutliche Signalanstiege beobachtet werden. In reinem Puffer ohne Lysat wurde dagegen kein Anstieg des Fluoreszenzsignals detektiert. Die Zugabe des bekannten Inhibitors **90** zum Lysat führte zu einer starken Verringerung der Caspase-9-Aktivität (Abbildung 47B). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Cytochrom C für die Aktivierung der Caspase im Zelllysatz essentiell ist. So war der Fluoreszenzanstieg in Anwesenheit des Kofaktors 3.5fach höher als ohne. Interessanterweise konnte die Aktivität der Caspase-9 auch durch die Zugabe von 500 nM rekombinanten BIR3-Proteins ähnlich gut wie mit **90** inhibiert werden. Der erhaltene Wert für **90** entspricht der in diesem Assay maximal erreichbaren Inhibierung der Caspase-9.

In einem folgenden Experiment wurde Zelllysatz mit steigenden Konzentrationen an BIR3 (0 – 150 nM) titriert und die Caspase-9-Aktivität gemessen. Wie aus Abbildung 48A ersichtlich ist, inhibiert BIR3 die Caspase-9 im Zelllysatz konzentrationsabhängig, wobei in Anwesenheit von nur 50 nM BIR3 die detektierte Aktivität bereits halbiert werden konnte. Daher wurde im Weiteren untersucht, ob das Peptid-PNA-Konjugat **61a** die Caspase-9 aus dem inhibitorischen Komplex mit BIR3 wieder verdrängen kann. Dafür wurde die Aktivität der Caspase-9 im Zelllysatz in Anwesenheit von BIR3 und **61a** untersucht. Zur Kontrolle wurde die Caspaseaktivität bei Zugabe des Inhibitors **90** vermessen. Der erhaltene Wert entspricht dann 0% an aktiver Caspase, wobei die Aktivität in reinem Lysatz 100% entspricht. Die Zugabe der Chimäre **61a** allein hatte keine Auswirkung auf die Enzymaktivität. In Gegenwart von 50 nM BIR3 wurde die Caspase inhibiert und die Caspase-9-Aktivität lag bei nur noch 20% im Vergleich zum reinen Lysatz. Mit 1 μ M **61a** konnte die Aktivität auf ca. 60% gesteigert werden. Damit konnte das Transferprodukt **61a** die Caspase-Blockade durch BIR3 größtenteils aufheben. Dieser Effekt war auch konzentrationsabhängig. So waren in Gegenwart von 100 nM BIR3 8% der Caspase-9 im Zelllysatz aktiv. Die Zugabe von 1 μ M **61a** kann die Aktivität bis zu 18% und 10 μ M **61a** bis zu 65% rekonstituieren.

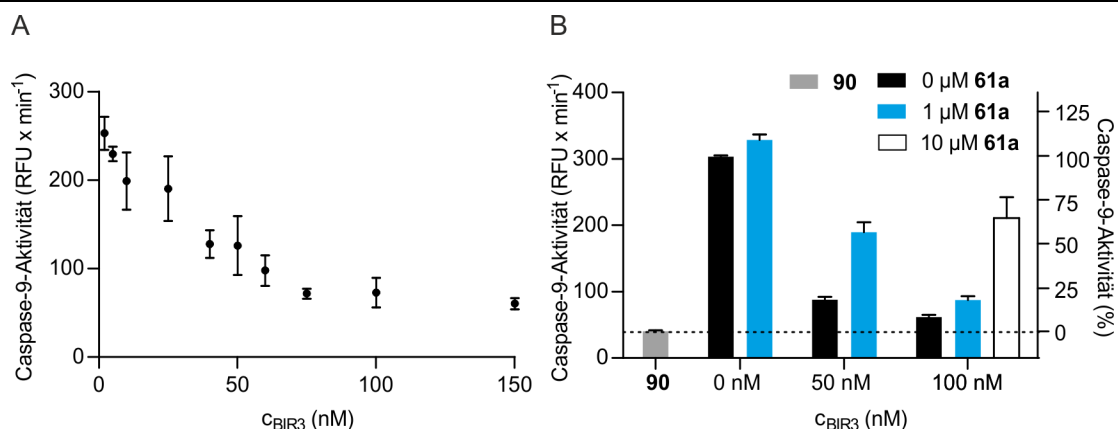


Abbildung 48: A) Titration von Zelllysats L mit BIR3. B) Reaktivierung der Caspase-9 durch Zugabe von Transferprodukt **61a**. Bedingungen: 25 μ L Zelllysats (A: Gesamtproteingehalt 3.4 g/L, 50% L; B: Gesamtproteingehalt 3.8 g/L, 50% L) in Puffer (20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM TCEP, 10 μ M CytC, 2 mM ATP, pH 7.4) wurden mit 40 μ M **90** oder steigenden Konzentrationen BIR3 und/oder Transferprodukt **61a** versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 μ L einer 100 μ M Lösung von **87** in Puffer zugegeben. (Endvolumen 50 μ L); λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 485 nm. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

Nun wurde überprüft, ob die Aktivität der Caspase-9 des inhibierten Enzyms auch durch das *in situ* gebildete Transferprodukt **61a** wiederhergestellt werden kann. Dazu wurde zunächst der Einfluss aller an der Transferreaktion beteiligten Reaktanten (**58a**, **59a**, **Ma** und **Mi**) auf die Caspase-Aktivität untersucht. Es wurden je 30% Zelllysats in Puffer mit 1 μ M **58a**, **59a**, **Ma** oder **Mi** versetzt und die ermittelte Caspase-Aktivität mit der in reinem Lysat verglichen. Wie erwartet hatte keine der Komponenten einen Einfluss auf die Caspase-9-Aktivität (Abbildung 49A). Im Folgenden wurde die Transferreaktion mit dem Thioesterkonjugat **58a** und dem Akzeptorkonjugat **59a** im Zelllysats und in Gegenwart von 100 nM BIR3 durchgeführt und die Caspase-Aktivität beobachtet (Abbildung 49B). Die Zugabe von 100 nM BIR3 bewirkte eine Abnahme der Caspase-9-Aktivität. In Anwesenheit des DNA-Templats **Ma** allein (nur **Ma**) wurde die Aktivität nicht wieder hergestellt, ebenso wenig bei Durchführung der Transferreaktion ohne Templat (HG) oder in Gegenwart des fehlgepaarten Templats **Mi**. Dies entsprach den Erwartungen, da in diesen Fällen kein Transferprodukt gebildet werden sollte. Allerdings wurde die Aktivität des Enzyms zum Teil unter den Wert für 100 nM BIR3 gesenkt. Dies sollte, selbst wenn kein Transferprodukt gebildet würde, nach den Kontrollexperimenten aus Abbildung 49A nicht zu beobachten sein, da die Edukte der Reaktion allein keinen Einfluss auf die Caspase-Aktivität ausübten. Durch Ausführen der Transferreaktion in Gegenwart von 1 Äq. und 0.5 Äq. **Ma** konnte ebenfalls keine Aktivierung, sondern eine weitere Verminderung der Caspase-Aktivität beobachtet werden.

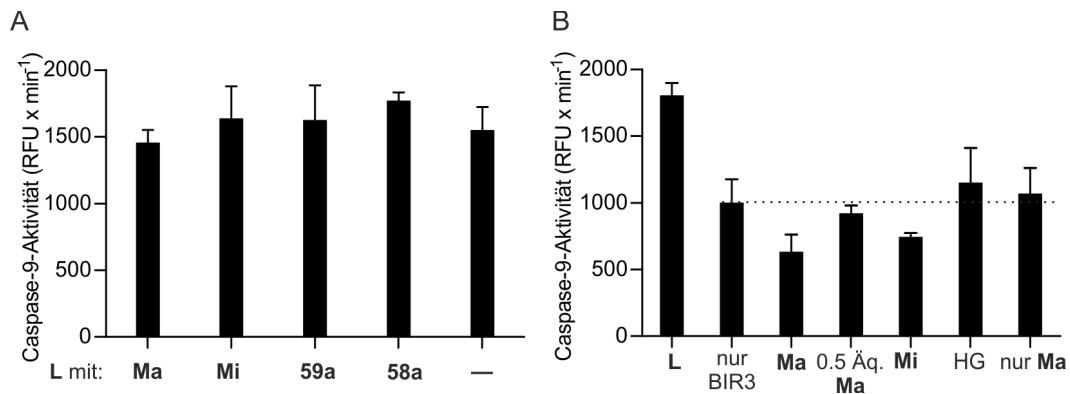


Abbildung 49: A) Caspase-9-Aktivität in Zelllysats **L** in Anwesenheit der Reaktanten der Transferreaktion. B) Reaktivierung der Caspase-9 durch *in situ* generiertes Transferprodukt **61a** in An- bzw. Abwesenheit (HG) von 1 Äq. des komplementären Templates **Ma**, 0,5 Äq. **Ma**, mit 1 Äq. **Mi** bzw. bei Zugabe des DNA-Templats **Ma** allein. Bedingungen: 25 μ L Zelllysats (A: Gesamtproteingehalt 5.3 g/L, 30% **L**; B: Gesamtproteingehalt 6.0 g/L, 40% **L**) in Puffer (20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM TCEP, 10 μ M CytC, 2 mM ATP, pH 7.4) wurden mit A) 1 μ M **58a**, **59a**, **Ma**, **Mi** und B) 100 nM BIR3 und den Edukten der Transferreaktion (1 μ M **59a**, 1.5 μ M **58a**, 1 oder 0.5 Äq. **Ma** (wenn zugegeben), 1 Äq. **Mi**) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 μ L einer 100 μ M Lösung von **87** in Puffer zugegeben. (Endvolumen 50 μ L); λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 485 nm. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

Mit diesen Experimenten konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob das Transferprodukt **61a** während der Reaktion gebildet wird, dann aber nicht mit BIR3 wechselwirken kann oder ob es eventuell im Zelllysats nicht generiert wird. Auch zeigte sich, dass die Ergebnisse von Experiment zu Experiment schlecht reproduziert werden konnten (nicht gezeigt). Die bisherigen Resultate zeigten aber auch, dass das Transferprodukt **61a** allein die Inhibierung der Caspase-9 durch BIR3 aufheben kann. Die einzelne Zugabe der Transferedukte hatte keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Dagegen scheint die Gegenwart aller Komponenten (der Peptid-PNA-Konjugate **58a** und **59a** sowie der DNA **Ma** oder **Mi**) im Zelllysats die Caspase-Aktivität zu verringern und die Bildung des Transferprodukts oder dessen Bindung an BIR3 zu verhindern.

Untersuchung der Caspase-3-Aktivität in Zelllysats

Die Aktivität der Caspase-9 kann auch indirekt gemessen werden, indem die Aktivität der nachgeschalteten Caspase-3 beobachtet wird (Abbildung 17). Da die katalytische Aktivität beider Caspasen ausgenutzt werden kann, sollte diese Methode zu einer Signalamplifikation führen. Als Substrat für die Caspase-3 diente das AFC-markierte Peptid **91** (Abbildung 50B).

Zunächst wurde wieder eine Verdünnungsreihe von HEK-Zelllysats hergestellt und die Aktivität der Caspase-9 und Caspase-3 darin gemessen (Abbildung 50A). Die Messung der Caspase-3-

Aktivität lieferte dabei höhere Anstiege als für die Caspase-9. Bereits 10% des Lysats in Puffer lieferten ein hohes Signal. Dies hatte auch den Vorteil, dass für die Messungen weniger Zelllysate benötigt wurde.

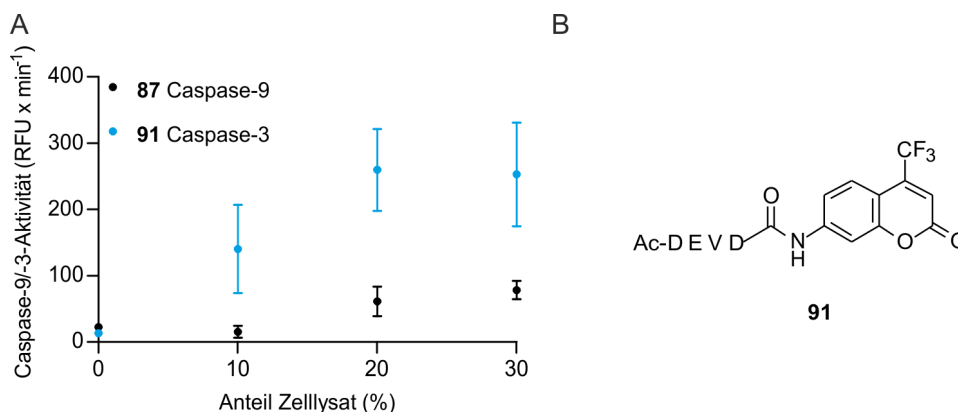


Abbildung 50: A) Caspase-3- bzw. Caspase-9-Aktivität mit steigendem Anteil (0% – 30%) an Zelllysate **L** (Gesamtproteingehalt 5.5 g/L) in Puffer (20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM TCEP, 10 μ M CytC, 2 mM ATP, pH 7.4) (Endvolumen 25 μ L) inkubiert bei 37 °C für 30 min. 25 μ L einer 100 μ M Lösung von **91** bzw. **87** in Puffer wurden zugegeben. (Endvolumen 50 μ L); λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 485 nm. B) Struktur des Caspase-3-Substrates Ac-DEVD-AFC **91**. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

Im Folgenden wurden 10% Zelllysate in Puffer mit 50 nM BIR3 versetzt und die Aktivität der Caspase-3 bei Zugabe des Transferprodukts **61a** oder bei Durchführung der Transferreaktion im Lysat gemessen (Abbildung 51). Die Zugabe von 50 nM BIR3 als Caspase-9-Inhibitor führte zu einer Verringerung der Caspase-3-Aktivität gegenüber dem reinen Lysat. In Abbildung 51A sind die erhaltenen Aktivitäten als relative Caspase-Aktivitäten dargestellt. Demnach entspricht die Aktivität der Caspase-3 in Lysat allein 100%. Die Aktivität in Gegenwart von BIR3 entspricht dann 0%. In Abwesenheit von Cytochrom C war keine Caspase-3-Aktivität detektierbar. Da Caspase-3 für die Aktivierung kein CytC benötigt, ist deren Inaktivität auf die fehlende Aktivierung der Caspase-9 zurückzuführen, die dann ihrerseits die Caspase-3 nicht aktiviert. Anschließend wurden zum Lysat mit 50 nM BIR3 steigende Konzentrationen des Transferprodukts **61a** titriert. Dabei wurde festgestellt, dass die Aktivität der Caspase-9 konzentrationsabhängig wieder hergestellt werden kann (Abbildung 51A). So konnten in Gegenwart von 1 μ M **61a** 6% und mit 10 μ M **61a** sogar 60% der Caspase-3-Aktivität wiederhergestellt werden. Allerdings konnte die Inhibierung der Caspase-3 in Gegenwart von BIR3-Protein nicht durch die *in situ* Generierung des Transferproduktes **61a** bei Durchführung der Transferreaktion mit **58a** und **59a** in Zelllysate aufgehoben werden (Abbildung 51B). So wurde zwar wie erwartet in Abwesenheit von **Ma** (HG) oder mit **Mi** kein Ansteigen der Enzymaktivität beobachtet, aber auch in Gegenwart des perfekt

komplementären Templats **Ma** konnte die Caspase-3, wie bereits für die Caspase-9 beobachtet, nicht reaktiviert werden.

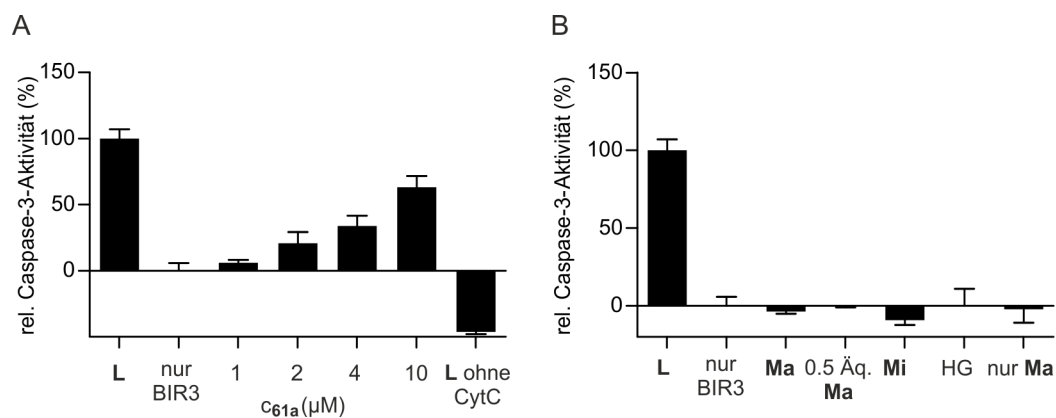


Abbildung 51: Reaktivierung der Caspase-3 durch A) die Zugabe von Transferprodukt **61a** und B) die *in situ* Durchführung der Transferreaktion in mit 50 nM BIR3 versetztem Zelllysats **L**. Bedingungen: 25 μL Zelllysats (Gesamtproteingehalt 5.5 g/L, 10% **L**) in Puffer (20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl_2 , 0.2 mM TCEP, 10 μM CytC (wenn zugegeben), 2 mM ATP, pH 7.4) wurden mit 50 nM BIR3 und A) steigenden Konzentrationen des Transferprodukts **61a** (1 μM – 10 μM) oder B) den Edukten der Transferreaktion (2 μM **59a**, 4 μM **58a**, 1 oder 0.5 Äq. **Ma** (wenn zugegeben), 1 Äq. **Mi**) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 μL einer 100 μM Lösung von **91** in Puffer zugegeben. (Endvolumen 50 μL); λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 485 nm. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

Untersuchung der Caspase-Aktivität in Zelllysats in Gegenwart von Detergenzien

In einigen Untersuchungen zur Caspase-Aktivität in Zelllysats wird dem Assaypuffer ein Detergenz zugesetzt.^[133,147,151,154] Stennicke *et al.* fanden sogar, dass die Aktivität der Caspasen-3, -6, -7 und -8 in Anwesenheit des Detergenz CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat) höher ist.^[155] In den hier durchgeführten Experimenten könnte die Anwesenheit eines Detergenz auch einen günstigen Einfluss auf die Löslichkeit und Verteilung der hydrophoben PNA-Sequenzen haben.

Triton X-100 ist ein nichtionisches Detergenz, das hydrophile und hydrophobe Bereiche aufweist aber keine Ladung besitzt. CHAPS weist eine zwitterionische Struktur auf (Abbildung 52B). Im Folgenden wurde die Aktivität der freien sowie der mit BIR3 inhibierten Caspase-3 in Gegenwart von 0.1% Triton X-100 bzw. 0.05% CHAPS untersucht. Aus Abbildung 52A geht hervor, dass die Aktivität der Caspase-3 in Anwesenheit der Detergenzien gemindert wird. Dieser Effekt ist für Triton X-100 stärker ausgeprägt als für CHAPS. Allerdings konnte die Caspase-Aktivität in beiden Fällen durch 200 nM BIR3 weiter verringert werden. In den folgenden Experimenten wurden dem Puffer 0.05% CHAPS zugesetzt.

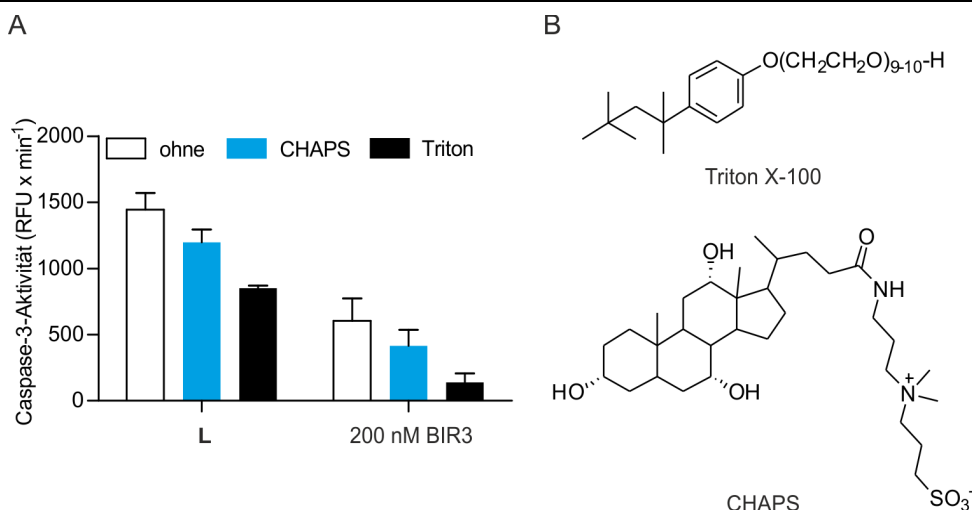


Abbildung 52: A) Caspase-3-Aktivität in 10% Zelllysats L verdünnt mit Puffer ohne oder mit 1% Triton X-100 bzw. 0.05% CHAPS sowie in An- oder Abwesenheit von 200 nM BIR3. Bedingungen: 25 µL Zelllysats (Gesamtproteingehalt 5.5 g/L, 10% L) in Puffer (20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM TCEP, 10 µM CytC, 2 mM ATP, pH 7.4) ohne oder mit 200 nM BIR3 wurden 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 µL einer 100 µM Lösung von **91** in Puffer zugegeben. (Endvolumen 50 µL; λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 485 nm. B) Struktur von Triton X-100 und CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

Zunächst wurden 10% Zelllysate in Puffer mit steigenden Konzentrationen an rekombinantem BIR3-Protein versetzt und sowohl die Aktivität der Caspase-9 als auch der Caspase-3 detektiert. Wie in Abbildung 53 gezeigt, lassen sich beide Caspasen konzentrationsabhängig durch BIR3 inhibieren. Aus den erhaltenen Daten kann mittels nichtlinearer Regression ein IC_{50} -Wert für die Inhibierung berechnet werden (siehe auch Anhang, Abbildung 70). Dabei wird einerseits die Aktivität der Caspase-9 direkt gemessen (Abbildung 53A), andererseits wird durch die Beobachtung der Caspase-3-Aktivität (Abbildung 53B) die Aktivität der Caspase-9 indirekt bestimmt. Daher sollte der IC_{50} für beide Messungen ähnlich sein. Tatsächlich ergibt sich für die Inhibierung der Caspase-9 ein IC_{50} von 53 nM und im Fall der Caspase-3 ein IC_{50} von 84 nM. Die Inhibitionskonstanten liegen damit auch in der gleichen Größenordnung wie sie von Fesik *et al.* für die Inhibierung einer isolierten Caspase-9 mit BIR3-Protein (Aminosäuren 241 – 356) ($IC_{50} = 22$ nM) bestimmt wurde.^[144]

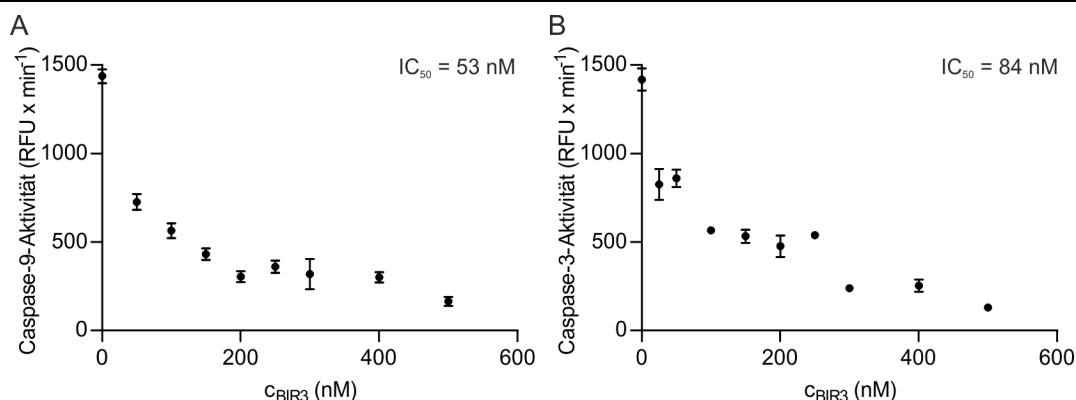


Abbildung 53: Titration von Zelllysats L mit steigenden Konzentrationen von BIR3. A) Inhibierung der Caspase-9 und B) der Caspase-3. Bedingungen: 25 μ L Zelllysats (Gesamtproteingehalt 3.4 g/L, 10% L) in Puffer (20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM TCEP, 0.05% CHAPS, 10 μ M CytC, 2 mM ATP, pH 7.4) wurden mit steigenden Konzentrationen BIR3 (0 – 500 nM) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 μ L einer 100 μ M Lösung von A) **87** und B) **91** in Puffer zugegeben. (Endvolumen 50 μ L); λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 485 nm.

Anschließend wurde die Reaktivierung der im Zelllysats mit 50 nM BIR3 inhibierten Caspasen-9 und -3 durch Titration mit den Transferprodukten **61a** und **61b** untersucht (Abbildung 54A und B). In beiden Fällen konnte die Caspase-Aktivität konzentrationsabhängig wiederhergestellt werden. Abbildung 54A und B zeigt die relativen Caspase-Aktivitäten, wobei die Aktivität der Caspasen in Zelllysats allein 100% Aktivität und 0% in Anwesenheit von 50 nM BIR3 entspricht. Dabei war das Transferprodukt **61a** effektiver als **61b**, obwohl letzteres im Anisotropieassay eine höhere Affinität zum BIR3-Protein zeigte (**61a**: IC₅₀ = 1.52 μ M, **61b**: IC₅₀ = 0.56 μ M). So konnte in Anwesenheit von 2 μ M **61a** 42% und mit 10 μ M **61a** sogar 89% der Caspase-9-Aktivität wiederhergestellt werden, während in Gegenwart von 2 μ M **61b** die Aktivität um 18% und mit 10 μ M **61b** um 61% gesteigert werden konnte. Die Aktivität der Caspase-3 wurde mit 10 μ M **61a** sogar komplett wiederhergestellt und in Anwesenheit von 10 μ M **61b** um 46% erhöht.

Die Experimente mit dem CHAPS-haltigen Puffer erlaubten letztlich auch die Caspase-Reaktivierung durch die bei der DNA-katalysierten Transferreaktion *in situ* gebildeten Transferprodukte **61a** und **61b** (Abbildung 54C und D). Zunächst wurden die Caspasen durch Zugabe von 50 nM BIR3 zum Zelllysats inhibiert. Anschließend wurde die Transferreaktion im Zelllysats mit **58a** und **59a** sowie **58a** und **59b** (jeweils 2 μ M des Akzeptorkonjugats **59a** oder **59b** und 4 μ M des Donorkonjugats **58a**) in An- und Abwesenheit des Templats **Ma** sowie mit der einzelbasenfehlpaarenden DNA-Sequenz **Mi** durchgeführt. So konnte in Gegenwart von 1 Äq. des komplementären Templats **Ma** bei der Reaktion zwischen **58a** und **59a** 27%, in Gegenwart von nur 0.5 Äq. **Ma** noch 21% der Caspase-9-Aktivität wieder hergestellt werden (Abbildung 54C).

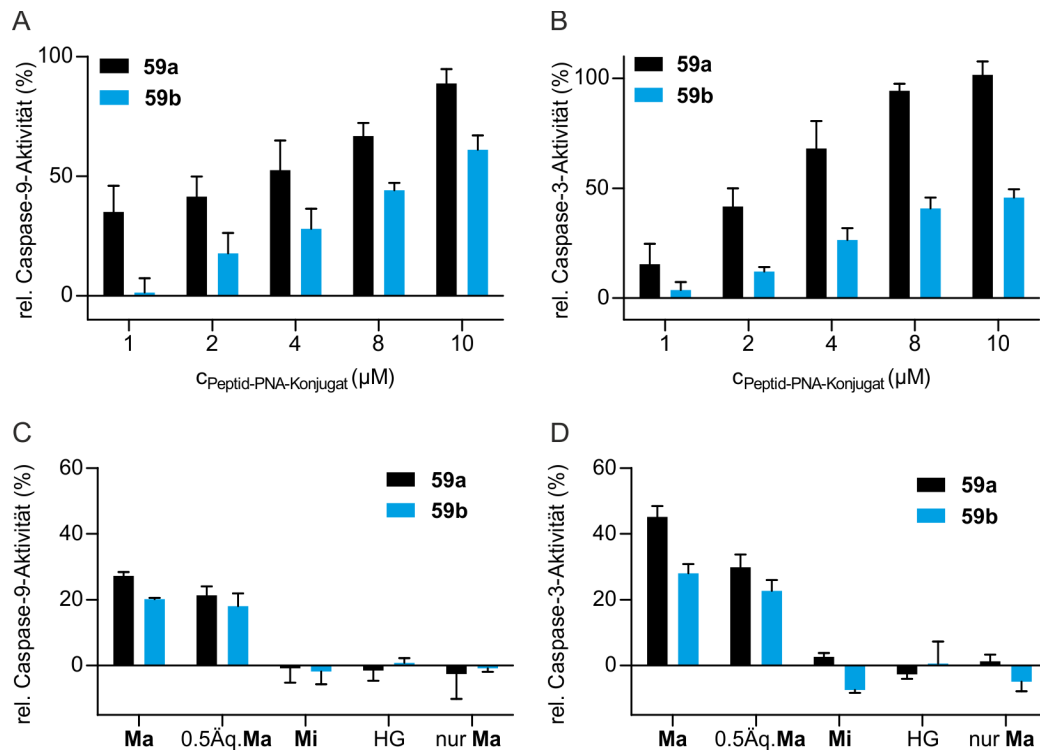


Abbildung 54: Reaktivierung der Caspase-9 (links) und Caspase-3 (rechts) durch A) und B) die Zugabe von steigenden Konzentrationen der Transferprodukte **61a** und **61b** und C) und D) die *in situ* Durchführung der Transferreaktion in mit 50 nM BIR3 versetztem Zelllysat **L**. Bedingungen: 25 µL Zelllysat (Gesamtproteingehalt 5.5 g/L, 10% **L**) in Puffer (20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM TCEP, 0.05% CHAPS, 10 µM CytC, 2 mM ATP, pH 7.4) wurden mit 50 nM BIR3 und A) und B) steigenden Konzentrationen der Transferprodukte **61a** und **61b** (1 µM – 10 µM) oder C) und D) den Edukten der Transferreaktion (2 µM **59a** bzw. **59b**, 4 µM **58a**, 1 oder 0.5 Äq. **Ma** (wenn zugegeben), 1 Äq. **Mi**) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 25 µL einer 100 µM Lösung von A) und C) **87** bzw. B) und D) **91** in Puffer zugegeben. (Endvolumen 50 µL); $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$. Dargestellt sind die normalisierten Mittelwerte aus drei Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

Für die analoge Reaktion von **58a** mit **59b** wurde eine Reaktivierung der Caspase-9 von 20% bzw. 18% erreicht. Damit erlaubt die *in situ* Generierung von **61a** eine effektivere Caspase-9-Aktivierung, obwohl das Transferprodukt **61a** in den kinetischen Untersuchungen weniger schnell gebildet wurde und im Bindungsexperiment eine geringere BIR3-Affinität zeigte als **61b**. Andererseits berichteten mehrere Gruppen, dass längere Smac-Peptide in Zellen effektiver Apoptose stimulieren können, als kürzere.^[103,156] Zudem wurde die Caspase-9-Aktivität in Abwesenheit von **Ma** (HG) oder bei Vorliegen des einzelbasenfehlgepaarten Templates **Mi** nicht erhöht. Ebenso wenig hatte das Template allein einen Einfluss auf die Enzymaktivität.

Im Folgenden wurde die Aktivität der nachgeschalteten Caspase-3 untersucht. Die ausschließliche Zugabe der reaktiven Konjugate **58a** und **59a** bzw. **59b** zeigte keinen Effekt auf die Caspase-3-

Aktivität (siehe auch HG = Hintergrund in Abbildung 54D). Jedoch führte die Zugabe kompletter DNA **Ma** bei der Reaktion von **58a** mit **59a** zu einer Erhöhung der Caspase-3-Aktivität um 45% (28% für die Reaktion von **58a** und **59b**). Substöchiometrische Konzentrationen des Templats (0.5 Äq.) führten zu einer 30%igen bzw. 23%igen Caspase-Aktivierung. Auch hier erfolgte die Transferreaktion sequenzspezifisch, da in Anwesenheit der fehlgepaarten DNA **Mi** die Caspase-3 nicht aktiviert wurde.

Zusammenfassend konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die DNA-Templat-katalysierte Synthese für die *in situ* Kontrolle einer Proteinaktivität auch in einer komplexen Umgebung wie Zelllysate geeignet ist. Bei dem Zielprotein handelte es sich um ein Schlüsselenzym des Apoptosignalwegs, dessen Nukleinsäure-kodierte Manipulation neue Therapiemöglichkeiten z. B. für Krebserkrankungen ermöglichen könnte.

4.5 Synthese von PEGylierten Konjugaten

Die bisherigen Untersuchungen in Zelllysate zeigten, dass die DNA-katalysierte Transferreaktion in einer komplexen, aus Biomolekülen zusammengesetzten Umgebung ein bioaktives Peptid-PNA-Konjugat generiert, welches in die Signalwege des programmierten Zelltods eingreifen kann. Die Anwendung dieses Konzepts in Zellen, mit intrazellulären Ziel-RNAs als Template, ist das nächste Forschungsziel. Dabei liegt eine der größten Herausforderungen sicher darin, die Konjugate in die Zellen zu transportieren.^[87] Die intrazelluläre Aktivität von kurzen, modifizierten Smac-Peptiden konnte bereits gezeigt werden.^[103,140] Besonders im Zusammenhang mit *anti-gen-* oder *antisense-*Anwendungen wurden bisher auch verschiedene Strategien vorgeschlagen, um die Zellgängigkeit von PNA-Sequenzen, beispielsweise durch Konjugation mit zellpenetrierenden Peptiden (CPPs) oder mit Hilfe von kationischen Lipidkomplexen wie Lipofectamin, zu erhöhen.^[86,157–159] Ein weiteres mit PNA-Sonden verknüpft Problem ist deren geringe Löslichkeit in wässrigen Medien und bei physiologischem pH sowie deren Tendenz zur Selbstaggregation.^[83,85] Kürzlich konnten Kummer *et al.* mit Hilfe von PNA-Sonden virale mRNA in lebenden Zellen nachweisen.^[95] Sie verwendeten PEGylierte FIT (*forced intercalation*)-PNA-Sonden, die durch Streptolysin O (SLO)-vermittelte Permeabilisierung der Zellmembran in lebende MDCK Zellen eingebracht wurden. Die Modifizierung mit PEG verhinderte dabei die Segregation sowie den nuklearen Import und eine unspezifische Bindung der PNA-Sonden an Proteine und andere Zellbestandteile.^[95,160] Bonora *et al.* zeigten, dass PEG-modifizierte PNA-Sequenzen in HeLa Zellen aufgenommen werden können und dort gut verteilt hauptsächlich im Zytoplasma vorliegen.^[161] Dagegen beobachteten sie bei den unmodifizierten Oligomeren punktartige Vertei-

lung in der Zelle, was die Forscher auf die Tendenz zur Selbstaggregation der PNA zurückführten.

Polyethylenglykole (PEGs) sind amphiphile Polymere, die aus Ethylenoxid-Einheiten aufgebaut sind. Die PEGylierung wird vor allem in der pharmazeutischen Forschung und Entwicklung eingesetzt, um Proteine, Peptide, kleine Moleküle und auch Oligonukleotide zu modifizieren und deren Wirkeigenschaften zu verbessern.^[162–164] Die Konjugation mit hydrophilen PEG-Resten kann dabei die Löslichkeit der Wirkstoffe erhöhen. Da die Konjugate für den Zugang zu proteolytischen Enzymen und Antikörpern abgeschirmt sind, erhöht sich auch die Stabilität der entsprechenden Wirkstoffe und verringert sich deren Immunogenität. Durch die Vergrößerung der Molekülmasse verlängert sich die Verweilzeit der Wirkstoffe, da die Ausscheidung über die Niere verhindert wird.^[139,165] Im Folgenden wurden Synthesestrategien zur PEGylierung der Peptid-PNA-Konjugate, die in der DNA-katalysierten Transferreaktion eingesetzt werden, untersucht.

Am weitesten verbreitet ist die PEGylierung an Aminofunktionen der entsprechenden Peptide oder Proteine, denn die benötigten PEG-Aktivester oder PEG-Carbonsäuren sind kommerziell erhältlich.^[164] Für die Akzeptorkonjugate **59a** und **59b** war zu beachten, dass eine N-terminale PEGylierung des Peptidrestes die für die Transferreaktion nötige α -Aminofunktion blockieren würde (Abbildung 55A und B).

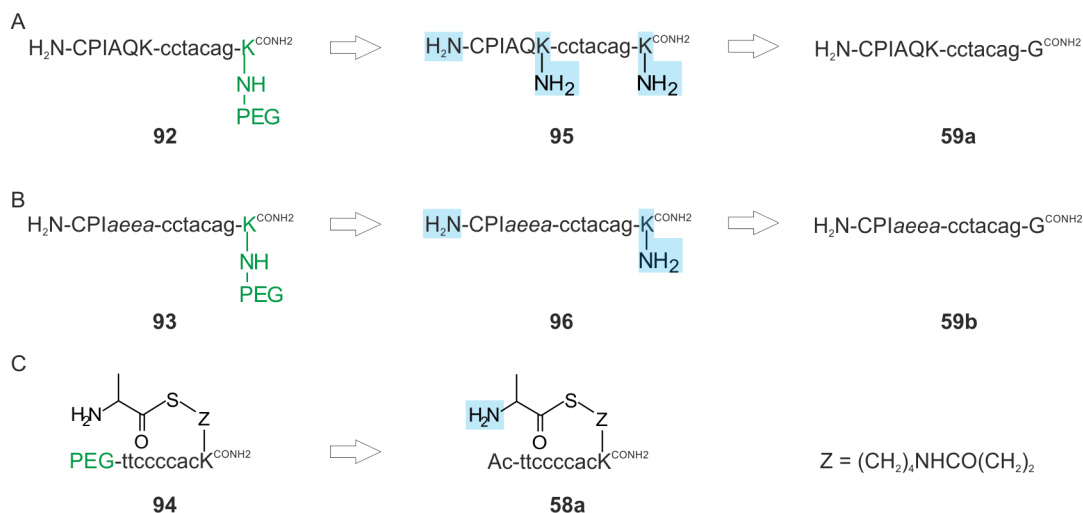


Abbildung 55: Retrosynthetische Analyse für die Synthese von **92** - **94**. Freie Aminofunktionen in **95**, **96** und **58a** sind blau unterlegt, wobei nur die PEGylierung der C-terminalen ϵ -Aminofunktion des Lysins gewünscht ist (grün in **92** und **94**).

Eine C-terminale Modifizierung ist durch den Einbau eines C-terminalen Lysins wie in **95** und **96** möglich. Allerdings musste eine Methode entwickelt werden, die es erlaubte, selektiv die ϵ -Aminofunktion des C-terminalen Lysins zu PEGylieren, ohne weitere Aminofunktionen in **95** und **96** zu modifizieren. Die Anbringung eines PEG-Restes im Donorkonjugat **58a** konnte ebenfalls nicht an der α -Aminofunktion des Alaninrestes erfolgen, da ein freier N-Terminus im Transferprodukt für die Bindung an BIR3 essentiell ist (Abbildung 55C). Für das Thioesterkonjugat sollte die N-terminale PEGylierung der PNA-Sequenz realisierbar sein. Im Weiteren wird die Entwicklung einer geeigneten Synthesestrategie für **92** - **94** beschrieben.

4.5.1 Konjugation mit polydispersem PEG

Zunächst wurde die Synthese von **93** (Abbildung 55) unter Verwendung einer polydispersen Mischung von PEG-Succinimidylester (PEGOSu **102** in Abbildung 56)^[95] mit einer Molmasse von 1900 – 2000 g/mol, untersucht. Dabei sollte eine selektive Kupplung von PEG an die ϵ -Aminofunktion eines C-terminalen Lysins erfolgen. Es wurden zunächst zwei mögliche Syntheserouten verfolgt, wobei die PEGylierung jeweils in Lösung erfolgen sollte (Abbildung 56). Zu Beginn wurde ein Rinkamid-Tentagel-Harz mit Fmoc-Lys(Boc)-OH unter Verwendung von PyBOP als Kupplungsreagenz beladen. Anschließend erfolgte an **97** der Aufbau der PNA-Peptid-Sequenz wie in Kapitel 2.2 beschrieben, um **98** zu erhalten. Das Harz wurde geteilt und die Fmoc-geschützte Sequenz **100** durch Behandlung mit TFA vom Harz abgespalten und HPLC-chromatographisch aufgereinigt. Im Konjugat **100** stand dann eine freie Aminofunktion für die Kupplung mit PEG zur Verfügung. Der andere Teil des Harzes **98** wurde mit 20% Piperidin in DMF behandelt, um die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe zu entfernen und anschließend vom Harz abgespalten und aufgereinigt um **99** zu erhalten. In **99** lag neben der C-terminalen ϵ -Aminofunktion der Lysinseitenkette auch die freie α -Aminofunktion des Konjugats vor. Hier wurde, in Anlehnung an Untersuchungen von Morpurgo *et al.*,^[166] untersucht, ob eine selektive PEGylierung der ϵ -Aminofunktion der Lysinseitenkette durch pH-Optimierung des Reaktionspuffers möglich ist. Demnach sollten bei einem pH > 8 sowohl die α -Aminofunktion als auch die ϵ -Aminofunktion des Lysinrestes deprotoniert vorliegen und damit die Reaktivität des Aminrestes von dessen Nukleophilie abhängen. Die Nukleophilie der Lysinaminofunktion ist dann größer und damit reaktiver gegenüber Elektrophilen, als die der α -Aminofunktion und unter diesen Reaktionsbedingungen sollte die Kupplung an der Seitenkette favorisiert sein.

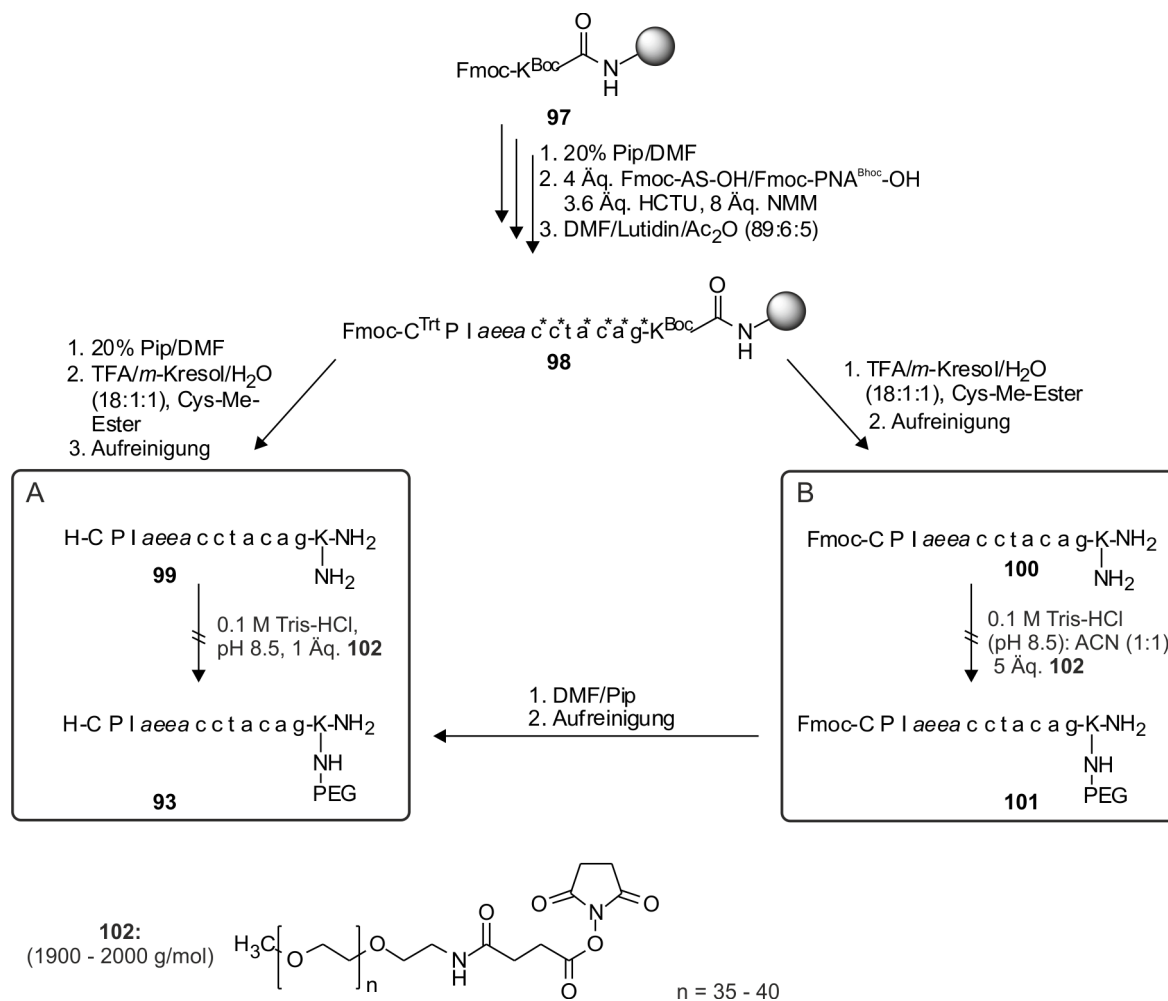


Abbildung 56: Syntheschema zur Synthese von **93** durch PEGylierung der A) ungeschützten Sequenz **99** und B) Fmoc-geschützten Sequenz **100** in Lösung unter Verwendung von polydispersem PEGOSu **102**. * = Bhoc-Schutzgruppe.

Daher wurde **99** in einem 0.1 M Tris-Puffer (pH 8.5) (Endkonzentration 0.1 mM) mit PEGOSu **102** umgesetzt (Abbildung 56A). Es wurde nur 1 Äq. PEG-Aktivesters eingesetzt, um die Selektivität der Kupplung zu erhöhen. Das Fmoc-geschützte Konjugat **100** wurde ebenfalls in einer Mischung aus 0.1 M Tris-Puffer (pH 8.5) und 50% ACN mit 5 Äq. PEGOSu zur Reaktion gebracht (mit einer Endkonzentration für **100** von 1 mM und für **102** von 5 mM) (Abbildung 56B). Allerdings konnte in beiden Fällen auch nach einer Reaktionszeit von 24 h mittels MALDI-TOF-Analyse kein Produkt detektiert werden. Für eine erfolgreiche Kupplung sind vermutlich höhere Konzentrationen der Edukte erforderlich, die aufgrund der geringen Löslichkeit der Peptid-PNA-Konjugate allerdings nicht erreicht werden konnten. Daher wurde im Weiteren die PEGylierung an der festen Phase untersucht. Ein Rinkamid-Tentagel-Harz wurde zunächst mit Fmoc-Lys(Mmt)-OH beladen (**103**) und die Peptid-PNA-Sequenz in **104** aufgebaut (Abbildung 57A). Anschließend erfolgte die selektive Entschützung der ε-Aminofunktion des C-terminalen Lysins

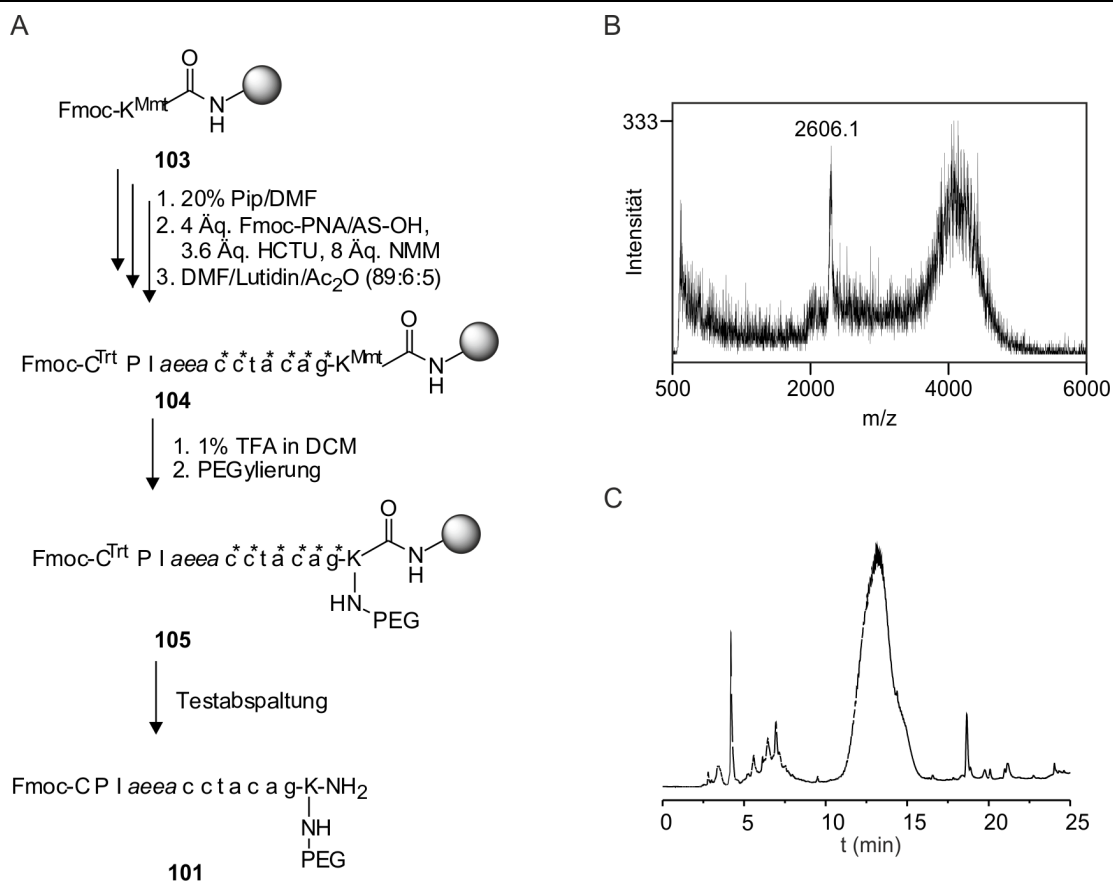


Abbildung 57: A) Schematische Darstellung der Synthese von **101** als Vorstufe für **93**. * = Bhoc-Schutzgruppe. B) MALDI-TOF-Spektrum und C) HPLC-Chromatogramm des Rohproduktes **101** nach PEGylierung mit 10 Äq. **102**, 10 Äq. DIPEA für 16 h. Gradient 4.

durch Behandlung mit 1% TFA in DCM und die Umsetzung mit PEGOSu **102** in Gegenwart von DIPEA, wobei unterschiedliche Reaktionsbedingungen untersucht wurden. Nach der entsprechenden Reaktionszeit wurde eine kleine Menge Harz für eine Testabspaltung mit TFA versetzt und die erhaltenen Produkte mittels MALDI-TOF analysiert. Das Harz wurde zunächst für 1 h mit 5 Äq. PEGOSu und 15 Äq. DIPEA in DMF umgesetzt, allerdings konnte keine Produktbildung beobachtet werden (nicht gezeigt). In einem weiteren Versuch wurden 10 Äq. PEGOSu in Gegenwart von 10 Äq. DIPEA in DMF zum Harz gegeben und für 16 h reagieren gelassen. Die MALDI-TOF Analytik nach der Testabspaltung zeigte ein Signal für die unmodifizierte Peptid-PNA-Sequenz **96** ((m/z) gef.: 2606.1, ber.: 2687.8; Abweichung durch Messung in Puffer) und ein breites Signal von m/z 3800 bis 4800 sowie im HPLC-Spektrum des Rohproduktes einen breiten Peak bei einer Retentionszeit von 11 min bis 16 min (Abbildung 57B und C). Dies sprach für die erfolgreiche Kupplung von PEG an **104**. Allerdings zeigte sich hier auch der Nachteil polydisperser Polymere. Die Polydispersität des PEGs resultiert in einer Polydispersität

des Konjugats. Dies erschwerte die Aufreinigung und insbesondere Charakterisierung des PEGylierten Konjugats. Das Problem bestand darin, dass, da der C-Terminus der Peptid-PNA-Sequenz modifiziert wird, PEG auch an Abbruchsequenzen gekuppelt wurde. Im Weiteren bestimmte dann die PEG-Modifizierung die Eigenschaften des Konjugats wie Löslichkeit (erwünscht) und Hydrophilie. Damit konnten PEGylierte Abbruchsequenzen mittels HPLC nicht vom gewünschten Produkt abgetrennt werden.

4.5.2 Konjugation mit monodispersem PEG

Für die weiteren Versuche zur PEGylierung von **58a**, **59a** und **59b** wurde monodisperses PEG als Succinimidaktivester (MS(PEG)₂₄ **110**, Abbildung 58) verwendet. Die Kupplung des PEG erfolgte an der festen Phase.

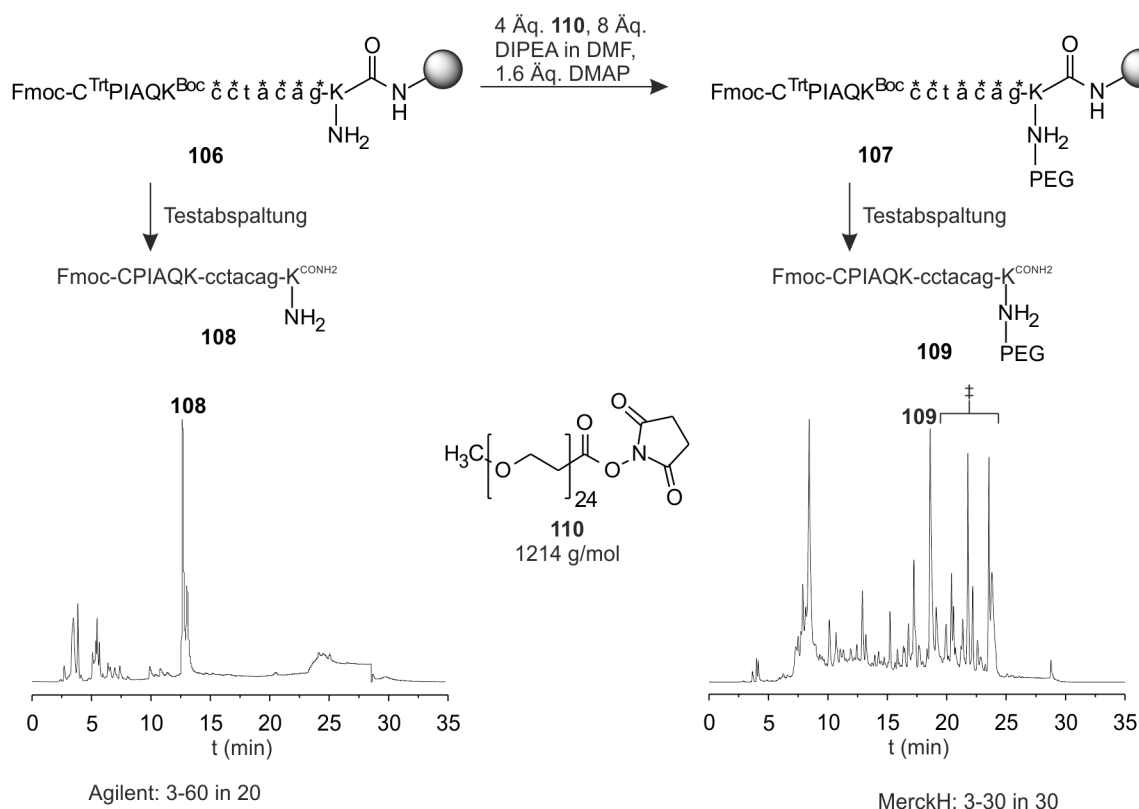


Abbildung 58: oben: Schematische Darstellung der Synthese von **109** als Vorstufe von **92** ausgehend von **106** (* = Bhoc-Schutzgruppe); unten: HPLC-Chromatogramme des Rohproduktes **108** (Gradient 5) und **109** (Gradient 6; ‡ = PEGylierte Abbruchsequenzen). Mitte: Struktur von MS(PEG)₂₄ **110**.

Zunächst wurde, wie in Abbildung 57 beschrieben, an dem mit Fmoc-Lys(Mmt)-OH beladenen Rinkamid-Tentagel-Harz **103** die N-terminal Fmoc-geschützte Peptid-PNA-Sequenz in **106** aufgebaut (Abbildung 58). Es wurde eine Testabspaltung vorgenommen, um die Bildung der gewünschten Sequenz **108** zu überprüfen. In Abbildung 58 ist das HPLC-Chromatogramm des

erhaltenen Rohprodukts zu sehen. Bei dem Hauptpeak bei 12.7 min handelt es sich um die gewünschte Sequenz **108**. Weiter wurden im Bereich zwischen 3 – 10 min Abbruchsequenzen nachgewiesen. Anschließend wurde die ϵ -Aminofunktion des C-terminalen Lysins selektiv durch Behandlung mit 1% TFA in DCM geschützt, wobei die weiteren Seitenkettenschutzgruppen erhalten blieben. Dann erfolgte die PEGylierung durch Behandlung des Harzes **106** mit 4 Äq. MS(PEG)₂₄ **110** in Gegenwart von 8 Äq. DIPEA und 1.6 Äq. DMAP in DMF für 16 h. Eine kleine Menge des Harzes **107** wurde für eine Testabspaltung verwendet und das erhaltene Rohprodukt HPLC-chromatographisch analysiert. Wie in Abbildung 58 zu erkennen, lieferte die Reaktion ein Produktgemisch, in dem das Produkt **109** mittels präparativer HPLC nicht vollständig von den Nebenprodukten abgetrennt werden konnte. Einige der Peaks konnten PEGylierten Abbruchsequenzen zugeordnet werden (§ in Abbildung 58), allerdings war die Vielzahl der gebildeten Nebenprodukte unerwartet und konnte zum Großteil nicht zugeordnet werden.

Da die PEGylierten Produkte mit der beschriebenen Synthesestrategie trotz Verwendung von monodispersen Polymer nur unzureichend gebildet wurden, aber vor allem nicht aufgereinigt werden konnten, wurde eine weitere Synthesestrategie untersucht (Abbildung 59). Dabei wurde erneut das Fmoc-Lys(Mmt)-OH beladene Rinkamid-Tentagel-Harz **103** eingesetzt. Nach Freisetzung der ϵ -Aminofunktion des Lysins durch Behandlung mit 1% TFA in DCM, erfolgte die Kupplung des PEGs. Hierfür wurden 4 Äq. MS(PEG)₂₄ **110** und 8 Äq. DIPEA in DMF für 2 h zum Harz gegeben. Ein Kaiser-Test mit dem Harz **111** gab einen negativen Nachweis auf freie Aminofunktionen, so dass von einer vollständigen Kupplung des PEGs ausgegangen wurde.^[167] Es folgte der manuelle Aufbau der PNA-Sequenz in **112**, wobei nicht wie gewöhnlich 4 Äq. sondern 10 Äq. des Fmoc-geschützten PNA-Monomers mit 10 Äq. PyBOP und 20 Äq. NMM in DMF eingesetzt wurden, um die Bildung von Abbruchsequenzen zu vermeiden. Das Harz **112** wurde geteilt und für den Aufbau der Peptidsequenzen in **113** und **114** verwendet. Auch hier wurden die verwendeten Äquivalente der zu kuppelnden Aminosäure auf 10 Äq. in Gegenwart von HCTU, HOBT und NMM erhöht. Das Harz **113** bzw. **114** wurde erneut jeweils geteilt und je einerseits zuerst zur Fmoc-Entschützung mit 20% Piperidin in DMF und anschließend zur Freisetzung mit TFA behandelt, um **92** und **93** zu erhalten. Andererseits wurde jeweils durch einen weiteren Reaktionszyklus N-terminal Alanin gekuppelt, Fmoc-entschützt und mit TFA behandelt um **115** und **116** als Rohprodukte vom Harz freizusetzen. Abbildung 60 zeigt als repräsentatives Beispiel das HPLC-Chromatogramm des Rohproduktes **93**. Darin sind zwei Hauptprodukte zu erkennen. Dabei handelt es sich bei $t_R = 8.3$ min um das Peptid-PNA-Konjugat **117** ohne die PEG-

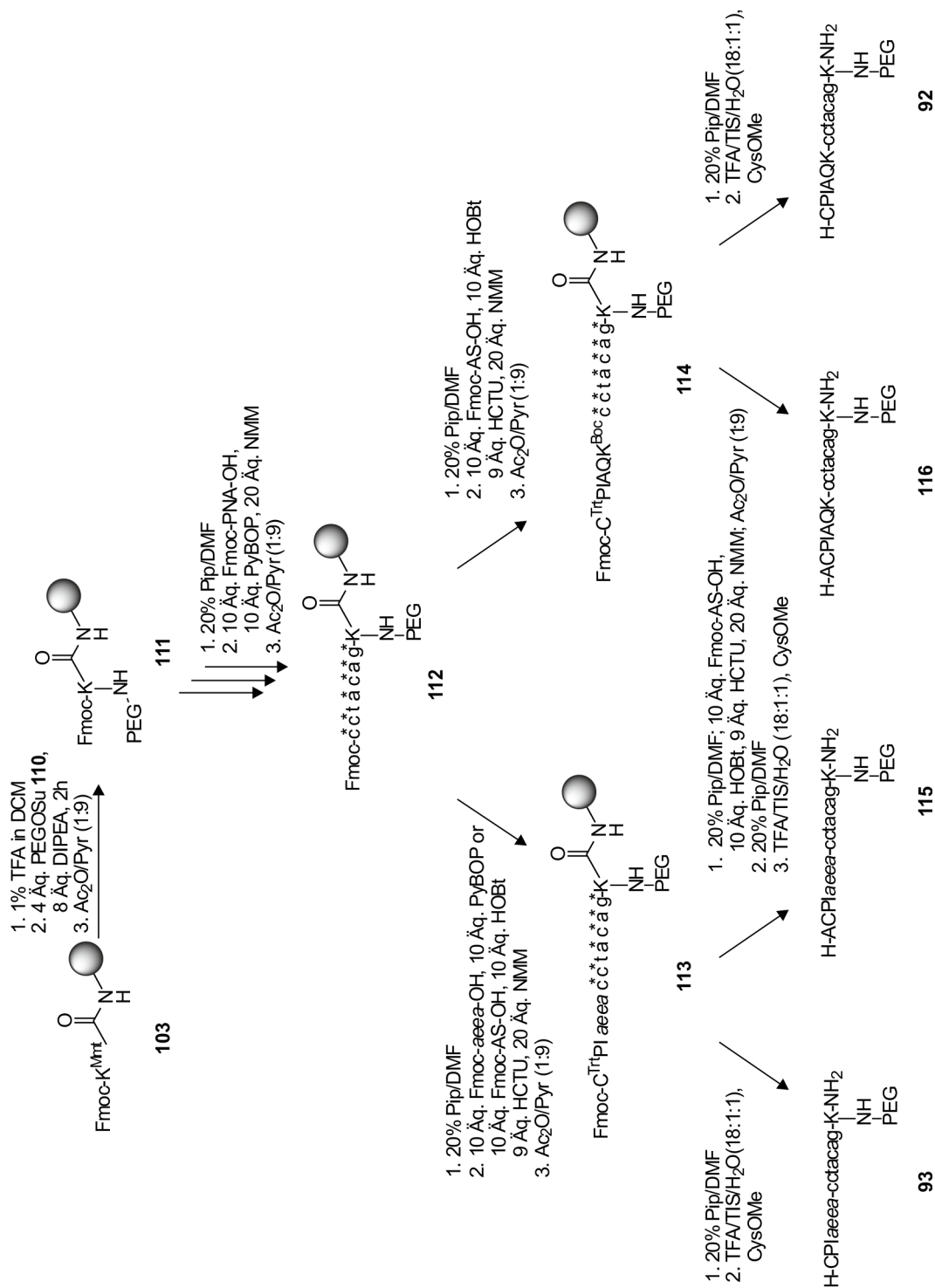


Abbildung 59: Schema zur Synthese der PEGylierten Peptid-PNA-Konjugate **92**, **93**, **115** und **116**.

Modifizierung und mit freier ϵ -Aminofunktion. Nach 19.3 min wurde das gewünschte PEGylierte Produkt **93** eluiert. Dieses ließ sich auch mittels präparativer HPLC gut von den Nebenprodukten abtrennen und isolieren. Eine Übersicht über die modifizierten Konjugate **92**, **93**, **115** und **116** und die erhaltenen Ausbeuten gibt Tabelle 7. Die Bildung der PEG-freien Produkte wie **117** war zunächst bemerkenswert. Eine unvollständige Kupplung des Polymers wäre möglich gewesen, da die Diffusion der relativ großen Moleküle in das vernetzte Harz erschwert sein könnte.^[168] Allerdings waren nach der Kupplung laut Kaiser-Test keine freien Aminofunktionen vorhanden. Gleichzeitig wäre zu erwarten gewesen, dass die freie ϵ -Aminofunktion während der nachfolgenden Syntheseschritte acetyliert worden wäre.

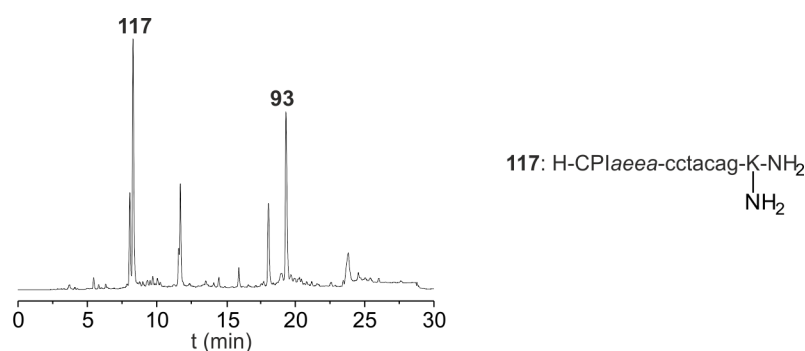


Abbildung 60: HPLC-Chromatogramm des Rohproduktes **93** und Struktur des Nebenproduktes **117** (Gradient 5).

Als Ursache für die Entstehung von **117** wurde daher zunächst vermutet, dass durch die PEGylierung der Zugang zu den reaktiven Gruppen sterisch gehindert war. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass das Polymer gegenüber den Reaktionsbedingungen während der Festphasensynthese nicht stabil war und dabei abgespalten wurde. Da allerdings die ϵ -Aminofunktion während der Synthese nicht acetyliert wurde, sollte dies erst während der letzten Syntheseschritte wie der Abspaltung vom Harz erfolgt sein. Auch die Synthese von **92**, **115**, **116** lieferte die PEGylierten und unmodifizierten Sequenzen in einem Verhältnis von ungefähr 1:1 und beide Hauptprodukte konnten jeweils isoliert werden.

In einem weiteren Versuch erfolgte die Synthese eines PEGylierten Donorkonjugats wie in **94** (Abbildung 55). Bei der hier vorgestellten Synthese wurde die Acetylgruppe am *N*-Terminus der PNA-Sequenz durch einen PEG-Gly-Rest ersetzt um **123** zu generieren. Die Synthese von **123** erfolgte nach der Boc/Z-Strategie an einem mit Boc-Lys(Fmoc)-OH beladenem MBHA-Harz **118** (Abbildung 61). Zunächst erfolgte der Aufbau der PNA-Sequenz durch die sich wiederholende Ausführung eines Reaktionszyklus aus Boc-Entschützung mit Hilfe von TFA in Gegenwart

von *m*-Kresol, Kupplung des Boc/Z-geschützten PNA-Monomers in mit PyBOP und NMM versetztem DMF und der Acetylierung der nicht umgesetzten Aminofunktionen durch Behandlung mit Essigsäureanhydrid in Pyridin. Anschließend wurde *N*-terminal ein Boc-Glycin gekuppelt um **119** zu erhalten. Das Harz wurde mit TFA/*m*-Kresol behandelt und dann der PEG-Rest an die freie α -Aminofunktion des Glycins gekuppelt. Es erfolgte hier nur die PEGylierung der Vollängen-PNA-Sequenz, da Abbruchsequenzen durch vorherige Acetylierung blockiert wurden. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe der ϵ -Aminofunktion des *C*-terminalen Lysins durch Behandlung mit 20% Piperidin in DMF entfernt und auf die freie Aminofunktion der Seitenkette Trt-geschützte Mercaptopropionsäure (MPS) gekuppelt (**121**).

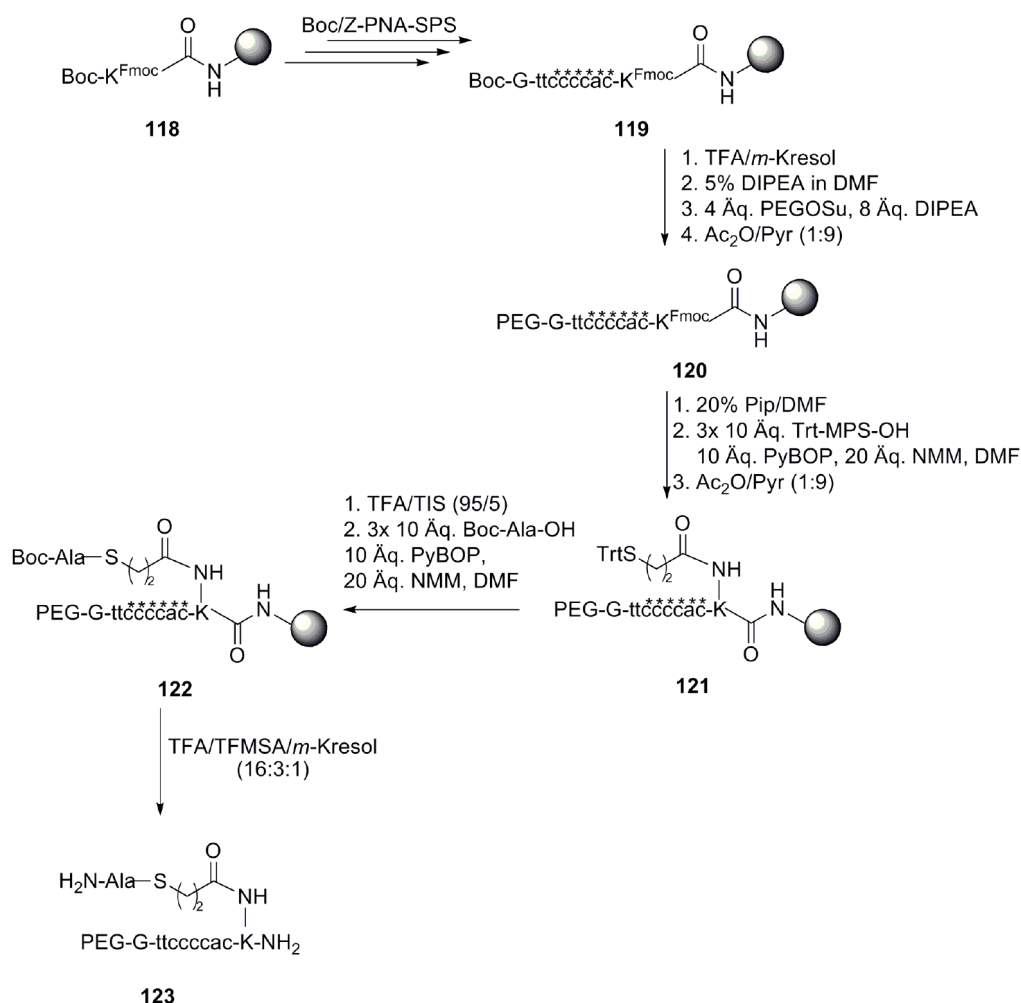


Abbildung 61: Schematische Darstellung der Synthese des PEGylierten Donorkonjugates **123** (MPS = Mercaptopropionsäure; * = Z-Schutzgruppe).

Zur Vermeidung von Abbruchsequenzen wurde das Harz dreimal mit 10 Äq. MPS, 10 Äq. PyBOP und 20 Äq. NMM in DMF umgesetzt. Das freie Thiol wurde durch Behandlung mit TFA

erhalten. Daraufhin konnte die Thioesterbindung zum Boc-geschützten Alanin geknüpft werden. Die Kupplung der Aminosäure wurde dreimal mit 10 Äq. Boc-Ala-OH, 10 Äq. PyBOP und 20 Äq. NMM in DMF wiederholt. Anschließend erfolgte die Freisetzung vom Harz **122** durch Behandlung mit TFA und TFMSA. Interessanterweise wurde in diesem Fall fast ausschließlich das gewünschte Produkt **123** generiert. Dagegen wäre zu erwarten gewesen, dass, falls die Vermutung einer sterischen Abschirmung durch die PEG-Modifizierung zutrif, die Kupplung der Mercaptopropionsäure (MPS) und des Alanins nicht vollständig erfolgt wäre. Auch eine generelle Instabilität des PEG-Restes gegenüber den während der Abspaltung verwendeten Säuren konnte aufgrund der erfolgreichen Synthese von **123** ausgeschlossen werden. Daher sollte die Entstehung der Nebenprodukte wie **117** auf eine, für die Modifizierung an der ϵ -Aminofunktion spezifische Reaktion zurückzuführen sein.

Eine Möglichkeit, die Entstehung der nicht-markierten Konjugate wie **117** zu verhindern, könnte dann darin liegen, die ϵ -Aminofunktion des Lysins zunächst mit einem Glycin zu verknüpfen und anschließend PEG auf die α -Aminofunktion des Glycins zu kuppeln. So berichteten Felix *et al.* über die Festphasensynthese von PEGylierten Peptiden, wobei die PEG-Modifizierung ebenfalls an der Seitenkette eines Lysinrestes erfolgte.^[169] Anschließend erfolgte, wie auch in der vorliegenden Arbeit, der Peptidaufbau mit Hilfe der Fmoc/*t*Bu-Strategie und die saure Abspaltung vom festen Träger. Dennoch beobachtete die Gruppe nicht den Verlust der PEG-Markierung. Allerdings verwendeten sie PEG-Derivate, die über einen Norleucin- oder Ornithinrest an die Aminofunktion gekuppelt wurden. Diese Aminosäurereste dienten dabei als diagnostisches Werkzeug, zur Bestimmung der absoluten Zahl an gebundenen PEG-Ketten am Peptid. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass diese Modifizierung auch die Stabilität der Peptid-PEG-Konjugate gegenüber den Reaktionsbedingungen erhöhte. Mögliche andere Synthesewege wären z. B. die Verwendung von monodispersen, heterobifunktionalen Amino-PEG-Säuren, wobei zunächst die Kupplung dieser PEG-Derivate auf das Harz und daran der Aufbau der Peptid-PNA-Sequenz erfolgen könnte. Andererseits könnte die Peptid-PNA-Sequenz mit Hilfe der Boc/Z-Strategie aufgebaut werden, da diese Strategie auch für die Generierung von **123** funktionierte. Weitere Syntheseoptimierungen sind also denkbar. Die hier synthetisierten PEGylierten Peptid-PNA-Konjugate sollen nun in der Arbeitsgruppe Brock (Nijmegen, Niederlande) für intrazelluläre Versuche verwendet werden. In Tabelle 7 sind die Sequenzen und Ausbeuten der PEGylierten Peptid-PNA-Konjugate noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 7: Übersicht über die PEG-markierten Peptid-PNA-Konjugate **92**, **93**, **115**, **116** und **123**.

Peptid-PNA-Konjugat	Sequenz	Ausbeute (%)
92	H-CPIAQK-cctacag-K(PEG)-NH ₂	11.7
93	H-CPI _{aaaa} -cctacag-K(PEG)-NH ₂	6.5
115	H-ACPIA _{aaaa} -cctacag-K(PEG)-NH ₂	2.4
116	H-ACPIAQK-cctacag-K(PEG)-NH ₂	4.3
123	PEG-G-ttcccccac-K(¹⁵ N A-S(CH ₂) ₂ CO)-NH ₂	7.0

4.6 Diskussion

Die molekular-biologische und –medizinische Forschung der letzten Jahrzehnte hat gezeigt, dass sich nahezu alle Krankheiten in einer veränderten genetischen Ausstattung manifestieren. Mit dem *Human Genome Project*, *Cancer Genome Project* sowie *Cancer Genome Atlas* werden Informationen über solche genetischen Veränderungen gesammelt und in immer größerem Umfang zugänglich gemacht.^[170–173] Die große Herausforderung liegt nun darin, diese Informationen für die Prävention aber vor allem Therapie von Erkrankungen wie Krebs auszunutzen. Einer interessanten Idee zufolge könnten die in den Nukleinsäuren kodierten Informationen dazu genutzt werden, spezifische und selektive Therapien nur auf erkrankte Zellen zu richten. Dabei würde eine krankheitsspezifische Nukleinsäuresequenz die Bildung oder Freisetzung eines Wirkstoffes bewirken. Gesunde Zellen und Gewebe würden dann weniger belastet und Nebenwirkungen könnten vermindert werden. Gleichzeitig erlaubte dieser Ansatz auch, dass individuelle genetische Unterschiede berücksichtigt werden können. Bisher vorgestellte Systeme basierten auf Nukleinsäuremolekülen, die die Nukleinsäureinformation auslesen und anschließend über antisense- oder RNAi-Effekte wiederum auf Nukleinsäuren wirken. Weiterhin wurde die Nukleinsäureerkennung zur Freisetzung von Modellwirkstoffen genutzt.

Hier wurde ein Reaktionssystem vorgestellt, bei welchem die Sequenzinformation eines DNA-Templats den Transfer einer Aminoacylgruppe von einem Thioester-Peptid-PNA-Konjugat auf eine Akzeptor-Peptidyl-PNA auslöst. Die Verwendung von PNA als Erkennungssequenz erlaubte die unkomplizierte Synthese der Peptid-PNA-Chimären und bewirkte eine gute Stabilität von diesen in biologischen Medien wie Zellysat. Durch die Wahl einer geeigneten PNA-Sequenz ist

der Ansatz theoretisch auf alle Krankheiten anwendbar, die durch die Überexpression bestimmter mRNA gekennzeichnet sind. Hier wurde eine DNA-Sequenz verwendet, die für einen Teil der karzinogenen Form des Signaltransduktionsproteins Ras, welche die Einzelbasenmutation G12V enthält, kodiert. Es wurde gezeigt, dass substöchiometrische Konzentrationen des Templat für eine effektive Transferreaktion genügen und, dass die Reaktion sequenzselektiv verläuft und in Gegenwart der Wildtyp-DNA-Sequenz kaum Produkt lieferte. Die entstehenden Peptid-PNA-Konjugate wurden so entworfen, dass sie die Protein-Protein-Interaktion zwischen der Caspase-9, einem Schlüsselenzym des programmierten Zelltods, und XIAP stören. So konnten die *in situ* generierten Transferprodukte **61a** und **61b** an die BIR3-Domäne von XIAP binden, wobei die PNA-Sequenz kaum einen Einfluss auf die Bindungsaffinität hatte. Weiterhin erlaubte die DNA-gesteuerte Peptidsynthese die Aktivierung der Caspase-9 und der nachgeschalteten Caspase-3 sogar in einer komplexen biologischen Umgebung wie Zellysat. Damit ermöglichte dieser Ansatz, im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymbindern, die Aktivierung statt der Inhibierung der Enzymfunktion und birgt damit einige Vorteile, da meist nur geringe Mengen eines aktiven Enzym nötig sind, um biologische Prozesse anzutreiben.^[174]

Die Entstehung der bioaktiven Peptid-PNA-Konjugate basierte auf der nukleinsäuregesteuerten Knüpfung von kovalenten Bindungen im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Systemen, bei denen vorrangig Esterbindungen gespalten wurden. Damit sollte die Wirkstoffgenerierung spezifischer erfolgen und Hintergrundreaktionen in Abwesenheit eines Nukleinsäuretemplats vermindert werden. Weitere Untersuchungen müssen nun zeigen, ob eine intrazelluläre Anwendung des vorgestellten Konzepts möglich ist. Allerdings lieferten einige Forschergruppen bereits ermutigende Ergebnisse. So wurde z. B. über zellgängige, funktionale Smac-Peptide in Form von Smac-Penetratin-Konjugaten berichtet und es existieren bzw. werden fortlaufend Methoden entwickelt, die den Transport von Peptiden und Nukleinsäuren in Zellen ermöglichen.^[103,175] Vor kurzem wurde in der Arbeitsgruppe Seitz der Transfer einer Reportergruppe sowohl an DNA- als auch RNA-Templaten gezeigt.^[68] Sowohl diese Ergebnisse als auch die hier gezeigten Untersuchungen in Gegenwart substöchiometrischer Templat-Konzentrationen lassen darauf schließen, dass zell-endogene, tumorspezifische RNA-Zielsequenzen den Wirkstoffaufbau induzieren könnten. Dies scheint auch deswegen realisierbar, da Kummer *et al.* mit Hilfe von PNA-Sonden intrazellulär virale mRNA nachweisen konnten.^[95] Bao *et al.* konnten durch die benachbarte Hybridisierung von *Molecular Beacons* an humaner mRNA, solche in lebenden Zellen nachweisen.^[176] Andererseits stellten Winssinger *et al.* ein Reaktionssystem vor, das die intrazelluläre Detektion von mRNA erlaubte, indem die Hybridisierung zweier, kurzer GPNA-Sequenzen am mRNA-Templat in

HEK-Zellen eine Staudingerreaktion auslöste.^[15] Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Cys-vermittelte Acyltransfer bedarf einer reduktiven Umgebung, die in Zellen normalerweise gegeben ist und Appella *et al.* konnten in einem *prodrug*-Ansatz bereits zeigen, dass Acyltransferreaktionen zellkompatibel sind.^[177] Die vorliegende Arbeit liefert damit erste Vorarbeiten für eine wirklich therapeutische Anwendung der nukleinsäuregesteuerten Peptidsynthese. Dabei sollen die PEG-modifizierten Konjugate bereits für erste Zellexperimente verwendet werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Das Potential von Nukleinsäuretemplat-gesteuerten Reaktionen hat sich in der organischen Synthese u. a. bei der Identifizierung neuer Reaktionen und der Generierung von Bibliotheken funktionaler Moleküle und Polymere gezeigt. Ebenso ermöglichen templatkontrollierte Reaktionen eine sehr sensitive und spezifische Detektion von DNA und RNA *in vitro* und *in vivo*. Kürzlich wurde gezeigt, dass durch Nukleinsäurehybridisierung die Freisetzung von Modellwirkstoffen induziert werden kann. Da die meisten Krankheiten durch genetische Mutationen ausgelöst werden oder individuelle genetische Unterschiede den Ausgang von Therapien beeinflussen können, würden spezifische Therapien auf Basis der genetischen Information eines Individuums selektivere und effektivere Behandlungsmethoden ermöglichen. Daher werden biokompatible Nukleinsäuretemplat-gesteuerte Reaktionen benötigt, die funktionale, bioaktive Moleküle freisetzen oder aufbauen.

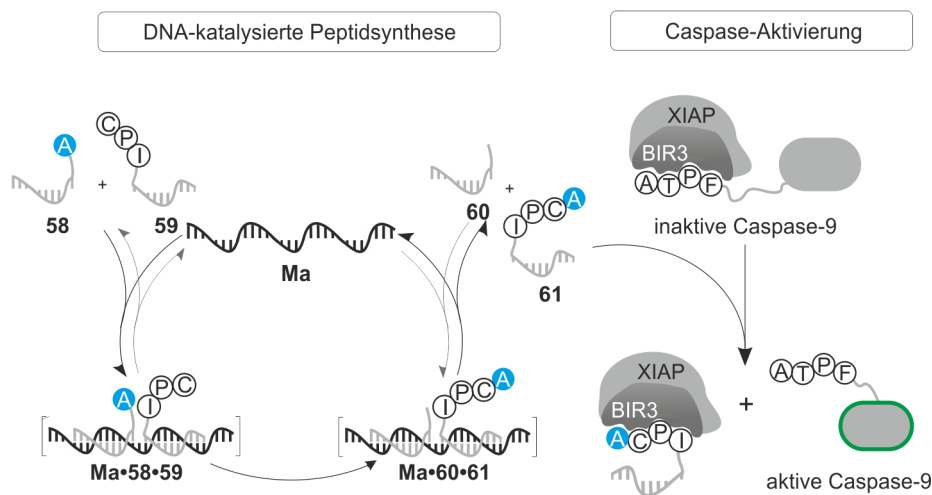


Abbildung 62: Konzept zur Caspase-9-Aktivierung mittels DNA-gesteuerter Peptidsynthese.

In dieser Arbeit wurde geprüft, ob eine sequenzspezifische Hybridisierung von zwei Peptid-PNA-Konjugaten die Bildung eines neuen Peptids auslösen kann, welches proapoptotische Eigenschaften besitzt. Dazu binden zwei kurze PNA-Oligomere an einem komplementären DNA-Templat und ermöglichen dadurch den Transfer einer Aminoacylgruppe (Abbildung 62). In den vorgestellten Untersuchungen trug ein Oligomer einen Alaninrest, welcher wie in **58** C-terminal

Zusammenfassung und Ausblick

als Thioester gebunden war. An das zweite PNA-Oligomer **59** war ein Peptid mit N-terminalem Cysteinrest geknüpft. Mittels einer Cystein-vermittelten Transferreaktion wurde die Aminoacyleinheit auf das Akzeptor-Konjugat übertragen und es entstand das freie PNA-Oligomer **60** sowie ein neues Peptid in **61**. Der Alanintransfer verlief, wie in meiner Diplomarbeit gezeigt, schnell und selektiv. So konnten für die Transferreaktion zwischen **58a** und **59a** bereits nach 30 min mehr als 60% Transferprodukt erhalten werden. Die Reaktion in Anwesenheit des komplementären DNA-Templats **Ma** verlief im Vergleich zur Umsetzung in Gegenwart der fehlpaarenden DNA **Mi** mit einer Selektivität von ca. 17:1. In Abwesenheit von **Ma** war die Reaktion um den Faktor 156 langsamer als in Anwesenheit der Ziel-DNA. Die Transferreaktion auf das Tripeptid-Linker-PNA-Konjugat **59b** verlief ebenso schnell aber mit einer größeren Selektivität von 28:1. Die Reaktion am Templat wurde um den Faktor 250 beschleunigt.

Die so generierten Peptid-PNA-Konjugate **61a** und **61b** wurden als Smac-Mimetika entworfen und konnten die inhibitorische Wechselwirkung zwischen der Caspase-9 und der BIR3 Domäne von XIAP aufheben und damit die Caspase-9 aktivieren. Mit Hilfe zweier Bindungsassays für die BIR3-Domäne wurde zunächst die Affinität der Peptid-PNA-Konjugate, die in der Transferreaktion eingesetzt wurden, untersucht. Es zeigte sich, dass die den Transferprodukten entsprechenden Hybride **58a** und **58b** sowie **59a – c** in dem, im Rahmen der Assays, verwendeten Konzentrationsbereichs keine Affinität für das Protein besitzen. Dagegen banden die Transferprodukte **61a** und **61b** mit einer Affinität, die mit der des Konjugats **64**, welches die natürliche Smac-Sequenz trägt, vergleichbar ist. Abbildung 63 zeigt die Inhibitionskurven und ermittelten IC_{50} -Werte für die Peptid-PNA-Konjugate wie sie im Fluoreszenzanisotropieassay bestimmt wurden.

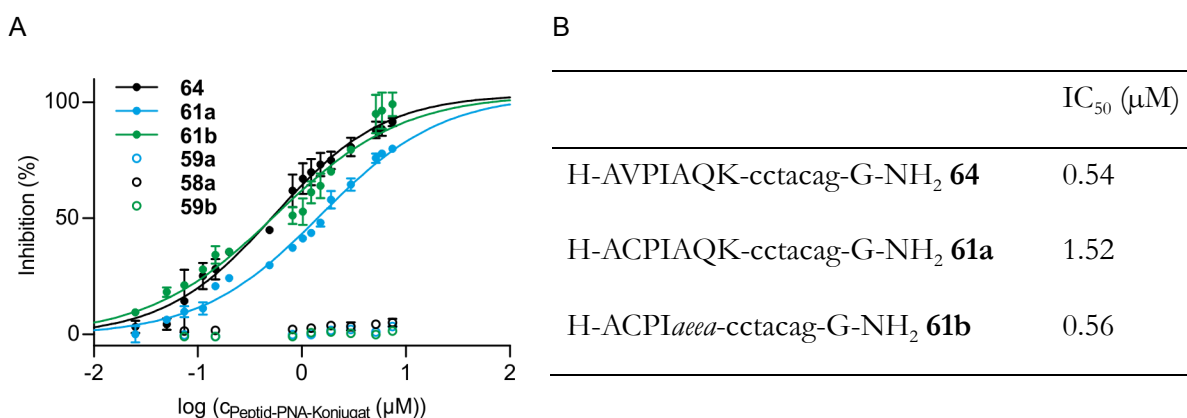


Abbildung 63: Inhibitionskurven (A) und ermittelte IC_{50} -Werte (B) der Peptid-PNA-Konjugate **61a**, **61b** und **64** die mit Hilfe eines Bindungsassays basierend auf Fluoreszenzanisotropie bestimmt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei Messungen mit Standardfehler.

Zusammenfassung und Ausblick

Der Austausch der zweiten Aminosäure im Smac-Peptid gegen ein Cystein sowie die Konjugation mit PNA-Oligomeren wurde demnach toleriert. Im Unterschied dazu führte eine zu große Sequenzänderung des Peptids, wie z. B. in **61c** (H-AVACAQK-cctacag-G-NH₂), zum Verlust der Bindungsaffinität gegenüber BIR3.

Es wurde beobachtet, dass das DNA-Templat **Ma** und auch dessen verkürzte Sequenz (**67**) das Referenzpeptid vom BIR3-Protein verdrängen können. Es wurde vermutet, dass dies auf eine unspezifische Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat zurückzuführen ist. Allerdings waren die randomisierten Sequenzen **68** und **69** nicht in der Lage, **65** zu verdrängen. Eine Polyacrylsäure **PAA** mit einem ähnlichen Ladungszustand wie **Ma** zeigte ebenfalls keine Bindung an BIR3. Andererseits konnte die Verdrängung des Referenzpeptids durch den Zusatz von Kationen wie Mg²⁺ und Spermin vermindert werden.

Die weiteren Untersuchungen zeigten auch, dass es möglich ist, das Referenzpeptid **65** durch die *in situ* generierten Peptid-PNA-Konjugate **61a** und **61b** aus dem Komplex freizusetzen. Die Verdrängung diente dabei als Modell für die Dissoziation des Komplexes aus XIAP und Caspase-9. So wurde die Transferreaktion zwischen **58a** und **59b** in Anwesenheit eines Komplexes des Referenzpeptids **65** und BIR3 durchgeführt. In Gegenwart von 1 Äq. des komplementären DNA-Templats **Ma** wurden nach 30 min 45% von **65** verdrängt, wenn 2 µM des Akzeptorkonjugats **59b** und 4 µM des Thioesters **58a** eingesetzt wurden.

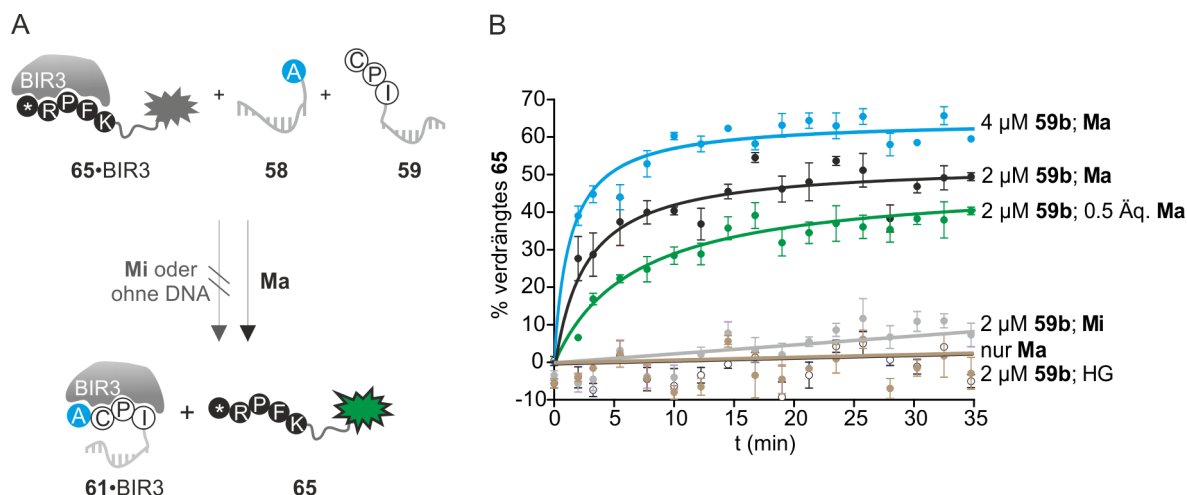


Abbildung 64: A) Schematische Darstellung der Kopplung der DNA-gesteuerten Transferreaktion mit dem Fluoreszenz-anisotropieassay. B) Verdrängung des Referenzpeptids **65** während der templat-katalysierten Transferreaktion in Gegenwart von BIR3-Protein.

Zusammenfassung und Ausblick

Der Anteil an verdrängtem Referenzpeptid nimmt mit der Zeit zu, da auch die Kompetitoren erst mit der Zeit in zunehmender Konzentration gebildet werden. Das Ausmaß der Verdrängung ist auch abhängig von der Konzentration der Transferedukte, da mit höheren Eduktkonzentrationen mehr Transferprodukt gebildet und damit mehr **65** verdrängt werden kann. Weiterhin wurde gezeigt, dass auch substöchiometrische Mengen des Templats die Bildung von Transferprodukt induzieren, die an BIR3 binden (35% mit 1 μ M **Ma** und **58a** sowie **59b**). Außerdem wurde gezeigt, dass in Abwesenheit von DNA-Templat oder in Anwesenheit des einzelbasenfehlpaarenden Templats **Mi 65** nicht vom Protein verdrängt wird, da kein Transferprodukt gebildet werden kann. Die Reaktion zwischen **58a** und **59a** führte in Gegenwart von **Ma** (stöchiometrische und substöchiometrische Konzentrationen) ebenfalls zu einer Verdrängung von **65**, allerdings mit einer geringeren Effektivität. Bei Anwesenheit des nicht passenden Templats **Mi** und in Abwesenheit von **Ma** wurde ebenfalls kein Transferprodukt gebildet und **65** nicht von der BIR3-Domäne verdrängt.

Die Peptid-PNA-Chimären **61a** und **61b**, die während der DNA-katalysierten Transferreaktion gebildet wurden, waren so konstruiert, dass sie an BIR3 binden und damit der Interaktion mit Caspase-9 entgegenwirken konnten, wobei sie nur in Anwesenheit des perfekt komplementären DNA-Templats gebildet werden sollten. Daher wurde ein Assay entwickelt, bei dem die DNA-gesteuerte Transferreaktion mit der Aktivierung der Caspase-9 aus dem inhibitorischen Komplex mit BIR3 kombiniert wurde. Dafür wurde zunächst rekombinante Caspase-9 aus dem *Caspase-9 Inhibitor Drug Screening Kit* von *BioVision* verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass im Reaktionspuffer DTT durch TCEP ersetzt werden kann. Außerdem konnte bei guten Signalintensitäten die eingesetzte Konzentration der Caspase-9 und des Substrates **87** (Abbildung 65) verringert werden. Die Zugabe des bekannten Peptidinhibitors **90** (Abbildung 65) führte, wie erwartet, zu einer vollständigen Inhibierung der Enzymaktivität. **90** bindet irreversibel am aktiven Zentrum der Caspase-9 und verhindert dadurch die Substratbindung. Im Gegensatz dazu ließ sich die Caspase-9 nur durch Zugabe sehr hoher Konzentrationen des BIR3-Proteins ($> 100 \mu$ M) inhibieren. Damit wären in einem Reaktivierungsexperiment sehr hohe Konzentrationen der Peptid-PNA-Konjugate nötig und der Assay nicht mit der templatkatalysierten Transferreaktion kombinierbar. Eine *active site titration* zeigte den Grund für die hohe benötigte Konzentration an BIR3 auf.

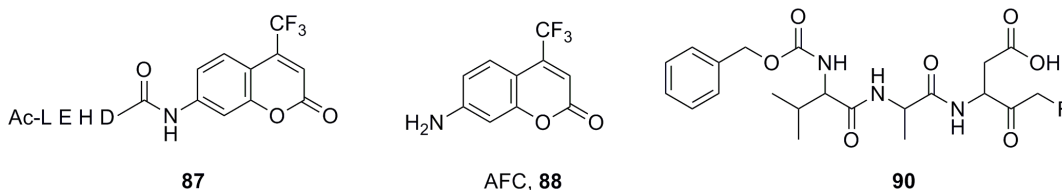


Abbildung 65: Strukturen des Caspase-9 spezifischen Substrats Ac-LEHD-AFC **87**, von AFC **88** und des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK **90**.

Demnach lag ein Großteil des Enzyms in seiner inaktiven Form vor. Das Substrat **87** und der Inhibitor **90** binden jeweils nur an die aktive Form der Caspase und die konkurrierende Bindung am aktiven Zentrum kann direkt aus den Fluoreszenzintensitäten des aus dem Substrat freigesetzten AFC (**88**) (Abbildung 65) abgeleitet werden. BIR3 inhibiert die Caspase-9 aber über einen anderen Mechanismus, indem es außerhalb des aktiven Zentrums bindet. Damit kann BIR3 auch von inaktivem Enzym gebunden werden, welches bei der Fluoreszenzdetektion kein Signal liefert, da es kein Substrat schneidet. Daher wurden hohe Konzentrationen des BIR3-Proteins benötigt, um einen Effekt auf die Enzymaktivität beobachten zu können. Durch die Zugabe des kosmotropen Salzes Natriumcitrat konnte die Konzentration an aktiver Caspase-9 im Enzymgemisch erhöht und damit eine Inhibierung bei geringeren Konzentrationen von BIR3 (ca. 50% bei 100 μ M BIR3) beobachtet werden. Diese Konzentrationen waren für einen Reaktivierungsassay mit den Peptid-PNA-Konjugaten immer noch sehr hoch. So wurden bei den Verdrängungsexperimenten das Referenzpeptid **65** aus einem Komplex von 5 nM **65** und 230 nM BIR3 verdrängt. Des Weiteren zeigte sich, dass die Peptid-PNA-Konjugate im hochkonzentrierten Citratpuffer ausfielen. Aus diesen Gründen war die rekombinante Caspase-9 von *BioVision* nicht für die Untersuchungen geeignet.

Die Aktivität von Caspasen kann auch direkt in Zelllysats untersucht werden. Dies hat den Vorteil, dass die am programmierten Zelltod beteiligten Proteine und Kofaktoren zusammen vorliegen. Der intrinsische Apoptosesignalweg kann dann über die Zugabe von Cytochrom C und dATP induziert werden. In der Tat wurde gezeigt, dass sich die Caspase-9 in HEK292-Zelllysats mit CytC und dATP aktivieren lässt. Durch Zugabe von rekombinantem BIR3-Protein wurde *in vitro* die Überexpression von XIAP, die in Krebszellen häufig zu beobachten ist und dort die Apoptose blockiert, simuliert. Im Zelllysats konnte die Aktivität der Initiatorcaspase-9 mit BIR3 konzentrationsabhängig vermindert werden. Die Zugabe der BIR3-bindenden Peptid-PNA-Konjugate **61a** und **61b** bewirkte die Reaktivierung der Caspase-9, d. h. die Konjugate konnte im Zelllysats durch Bindung an BIR3 der Wechselwirkung von Caspase-9 und BIR3 entgegenwirken und die

Zusammenfassung und Ausblick

Protease aus dem inhibitorischen Komplex befreien (Abbildung 66A). Dieser Effekt ließ sich auch zeigen, indem die Aktivität der nachgeschalteten Caspase-3 gemessen wurde (Abbildung 66B). Diese ist ebenfalls ein Substrat für die aktive Caspase-9 und weist erst proteolytische Aktivität auf, nachdem sie von der Caspase-9 aktiviert wurde. So resultierte die Inhibierung der Caspase-9 durch BIR3 auch in einer geringen Aktivität der Caspase-3 bzw. konnte deren Aktivität durch Zugabe von **61a** und **61b** erhöht werden. Da bei Beobachtung der Caspase-3-Aktivität die Signalamplifikation der enzymatischen Reaktionen genutzt wurde, konnte die eingesetzte Menge an Zelllysatsat verringert werden. Die Durchführung der DNA-katalysierten Transferreaktion zur *in situ* Generierung der Peptid-PNA-Konjugate **61a** und **61b** führte zunächst nicht zu einer Caspase-Aktivierung.

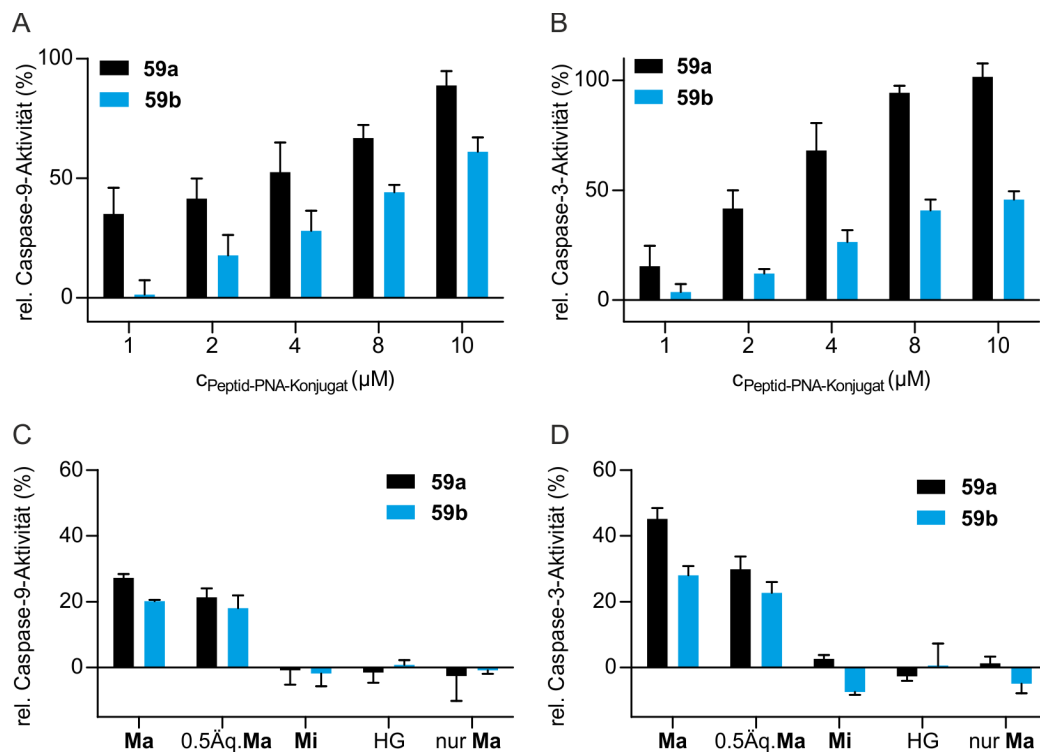


Abbildung 66: Reaktivierung der Caspase-9 (links) und Caspase-3 (rechts) durch A) und B) die Zugabe von steigenden Konzentrationen der Transferprodukte **61a** und **61b** und C) und D) die *in situ* Durchführung der Transferreaktion in mit 50 nM BIR3 versetztem Zelllysatsat L (2 µM **59a** bzw. **59b**, 4 µM **58a**, 1 oder 0.5 Äq. **Ma**, 1 Äq. **Mi**, ohne DNA (HG)). Dargestellt sind die normierten Mittelwerte aus drei Messungen; der Fehlerbalken zeigt den Standardfehler.

Erst in Gegenwart des Detergenz CHAPS gelang die Reaktivierung der Caspasen (Abbildung 66C und D). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass CHAPS die Löslichkeit der PNA-Konjugate im Zelllysatsat erhöht. Die Aktivierung gelang selektiv, d. h. in Gegenwart des fehlpaarenden Templots. In Abwesenheit des Templots blieb die Inhibierung der Caspasen erhalten.

Zusammenfassung und Ausblick

Eine intrazelluläre Anwendung des Nukleinsäuretemplat-katalysierten Peptidtransfers verlangt u. a. eine ausreichende Lebensdauer der verwendeten Konjugate in biologischer Matrix. Hier konnte gezeigt werden, dass die Anbringung von PNA-Oligomeren an die Smac-Peptide, deren Lebensdauer in Zelllysats verlängert. So wurde ein FAM-markiertes Peptid (**80**) im Zelllysats bereits innerhalb einer Stunde vollständig abgebaut, während die intakten Peptid-PNA-Konjugate noch nach 3 – 5 h nachgewiesen wurden.

Eine weitere Vorbereitung für eine intrazelluläre Anwendung der Nukleinsäuretemplat-katalysierten Peptidsynthese war die PEGylierung der verwendeten Peptid-PNA-Konjugate. Dazu wurde zunächst eine Synthesestrategie entwickelt, die es erlaubte die Akzeptor-Konjugate selektiv am C-Terminus zu modifizieren. Dabei erfolgte die Kupplung an der ϵ -Aminofunktion eines C-terminalen Lysinrestes. Eine PEGylierung in Lösung gelang nicht, da die Peptid-PNA-Konjugate keine ausreichende Löslichkeit aufwiesen. Die Kupplung des PEG-Restes an der festen Phase führte zur Produktbildung, sowohl wenn polydisperses als auch wenn monodisperses PEG verwendet wurde. Allerdings war im Falle der Verwendung des polydispersen Polymers die Abtrennung der Zielstrukturen von Abbruchsequenzen nicht möglich. Nach der PEGylierung mit dem monodispersen PEG-Aktivester **110** wurden die gewünschten Produkte **92**, **93**, **115** und **116** isoliert. Allerdings wurde ebenfalls die Entstehung der nicht PEGylierten Sequenzen wie in **117** beobachtet. Hier könnte zukünftig eine weitere Syntheseoptimierung und genauere Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus vorgenommen werden. Dagegen verlief die Synthese des PEG-modifizierten Thioesterkonjugats **123** unkompliziert und lieferte hauptsächlich das erwartete Produkt, bei dem die PEG-Modifizierung N-terminal an der PNA-Sequenz angebracht wurde.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit dem DNA-gesteuerten Aminoacyltransfer zum ersten Mal eine Methode aufgezeigt wurde, welche die in Nukleinsäuren kodierte Information für die Generierung eines Wirkstoffes nutzt, der die Aktivität eines Proteins, in diesem Fall eines Schlüsselenzyms der Apoptose, kontrollieren kann. Die Synthese des aktiven Peptidwirkstoffes gelang in der komplexen Umgebung von Zelllysats, erfolgte sequenzspezifisch und in Gegenwart substöchiometrischer Konzentrationen des Templates.

5.2 Ausblick

Die DNA-katalysierte Peptidsynthese erlaubte es, die Synthese von Peptiden unter die Kontrolle eines Nukleinsäuretemplates zu stellen. Die resultierenden Peptide waren biologisch aktiv und in

der Lage die Protein-Protein-Interaktion zwischen der Caspase-9 und der BIR3-Domäne des antiapoptotischen XIAP-Proteins zu inhibieren. Die bisher verwendeten Peptid-PNA-Konjugate ermöglichten vor allem den Transfer einer einzelnen Aminosäure an einem DNA-Templat zum Aufbau von Tetra- bis Heptapeptiden. Es ist aber auch von Interesse, die Nukleinsäuretemplat-katalysierte Peptidsynthese auf andere bioaktive Peptide und intrazelluläre Zielproteine zu übertragen und zu erweitern, um zu zeigen, dass das Prinzip generell anwendbar ist.

Bisherige Untersuchungen zur Kinetik der DNA-gesteuerten Peptidsynthese zeigten, dass die Variierung der Peptidlänge im Akzeptorkonjugat einen geringfügigen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der templatgesteuerten Transferreaktion hat, diese aber mit steigender Länge des Akzeptorpeptids abnimmt. Des Weiteren wurden vom Donorkonjugat erfolgreich ein Aminosäure-Farbstoff-Konjugat, die einzelne Aminosäure Alanin sowie das Tripeptid AVA am Templat übertragen. Hier wäre eine systematische Untersuchung über den Einfluss der Peptidlänge in den beteiligten Konjugaten sinnvoll. Weiterhin könnte die Reaktivität unterschiedlicher Thioesterstrukturen hinsichtlich des templatkatalysierten Peptidtransfers untersucht werden. So verlief der Transfer von längeren Peptidfragmenten bei Verwendung der bisherigen Thiollinker sehr viel langsamer als die Übertragung einer einzelnen Aminosäure.^[75] Bei dem DNA-Templat-katalysierten Transfer von fluoreszenten Reportergruppen wurden die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten bei Verwendung von Glycin-Thioestern mit kurzen Linkern beobachtet. Der Einbau von längeren Thiollinkern führte zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit. Für eine solche systematische Untersuchung der Thioesterstrukturen müssten auch neue Synthesestrategien für die benötigten PNA-Peptidthioester-Konjugate entwickelt werden. Hierbei wäre eine konvergente Strategie vorteilhaft.

Der Reaktionsmechanismus der hier gezeigten Transferreaktionen entspricht dem der nativen chemischen Peptidkupplung, weshalb die Anwesenheit eines *N*-terminalen Cysteinrestes im Akzeptorkonjugat notwendig ist. Die Erweiterung des Konzepts auf bioaktive Peptide, die kein Cystein enthalten, könnte dadurch gelingen, dass ein systematischer Austausch einzelner Aminosäuren gegen Cystein erfolgt und die Funktion der Peptide abhängig davon untersucht wird. Im Rahmen von Peptidligationen führten Glycin-, Alanin-, Phenylalanin-, Methionin-, Tryptophan- und Tyrosin-Thioester zu schnellen Ligationsreaktionen.^[178] Es wäre auch denkbar, dass Gly-Cys- und entsprechende Verknüpfungsstellen durch die Substitution zweier Aminosäuren in den funktionalen Peptiden zugänglich gemacht werden. Und schließlich könnten die Thiofunktionen in den Akzeptorkonjugaten durch Mercaptolysin^[179] oder Mercaptoleucin^[180] zur Verfügung gestellt

Zusammenfassung und Ausblick

werden. Wiederum muss dann der Einfluss der Modifikationen der Reste auf die Bindungsaffinität des untersuchten Peptids zum Zielprotein untersucht werden.

Die wohl größte Herausforderung für eine therapeutische Anwendung der nukleinsäuregesteuerten Peptidsynthese liegt in dem Transport der verwendeten Peptid-PNA-Konjugate in Zellen. Weitere Untersuchungen könnten sich darauf konzentrieren, zellgängige Derivate der Konjugate zu entwickeln und deren Funktion intrazellulär zu erforschen. Einige Voruntersuchungen in der Arbeitsgruppe Seitz konnten bereits zeigen, dass die Modifikation mit der zellpenetrierenden Octoarginin-Peptidsequenz einen Transport in Eukaryotenzellen erlaubt. Die hier synthetisierten PEGylierten Chimären können mittels Elektroporation oder Streptolysin O in Zellen eingeführt werden. Für erste Experimente könnten die entsprechenden Zellen zunächst mit einem geeigneten DNA-Templat transfiziert werden, welches anschließend den Peptidaufbau steuern kann. Ziel ist aber, die Synthese eines bioaktiven Peptids unter die Kontrolle einer zellendogenen z. B. krebsspezifischen mRNA-Sequenz zu stellen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Messgeräte und Hilfsmittel

Chemikalien: Die Fmoc- oder Boc-geschützten Aminosäuren wurden von *Senn Chemicals* oder *Biosolve*, Fmoc-Abu-OH von *Novabiochem* und Fmoc-Lys(Mmt)-OH von *Iris Biotech* bezogen. Als Kupplungsreagenzien wurden PyBOP, HCTU und HOBt von *Chemcube* und *Novabiochem* verwendet. Das MBHA- und das Rinkamid-Harz zur Verwendung in der Festphasensynthese wurden von *Novabiochem* bezogen. Der Fluoreszenzfarbstoff Badan (6-Bromacetyl-2-dimethylaminonaphthalen) wurde von der Firma *Anaspec*, 5(6)-Carboxyfluorescein (FAM) von *Acros* bezogen. Die Caspasesubstrate Ac-LEHD-AFC, Ac-DEVD-AFC und der Caspaseinhibitor Z-VAD-FMK wurden bei *ENZO Life Science* bezogen. Des Weiteren wurden Chemikalien von den Firmen *Acros*, *Aldrich*, *Fluka*, *Lancaster* und *Merck* verwendet. DNA wurde bei *BioTeZ Berlin-Buch GmbH* in HPLC Qualität erworben. Wässrige Lösungen wurden mit Wasser der Reinheitsstufe Milli-QPore hergestellt. Die Aufbereitung des Wassers erfolgte mit einer Millipore Anlage der Firma *Membrapure*.

MALDI/TOF-Massenspektrometrie: Es wurde das Gerät *VoyagerTM Biospectrometry Workstation* der Firma *PerSeptive Biosystems* verwendet. Zur Anregung wurde ein Stickstoff-UV-Laser der Wellenlänge $\lambda = 337$ nm eingesetzt (Beschleunigungsspannung: 20000 Volt, Grid: 95%, Guide Wire: 0.025%, Delay time: 100 ns). Als Matrix für PNAs und Peptide diente eine Lösung von 10 mg/mL Sinapinsäure in einem Gemisch von Acetonitril/Wasser (30:70) mit 0.1% TFA. Als Matrix für die DNA wurde eine Lösung (1:1) [v/v] von 3-Hydroxy-Picolonsäure in Acetonitril/Wasser (1:1) [v/v] und 50 mg/mL Diammoniumcitrat in Wasser verwendet.

Semi-präparative HPLC: Die Aufreinigung der Peptide und Peptid-PNA-Konjugate erfolgte mit einer 1100 HPLC-Anlage der Firma *Agilent*. Die Detektion der Signale erfolgte mittels eines Zwei-Kanal-UV-Vis-Detektors bei Wellenlängen von 260 nm und 210 nm. Als Trennmaterial diente eine *Polaris C18 A*-Säule der Firma *Varian* (5 μ , 250 \cdot 2 mm, Porengröße 100 Å). Die Produkte wurden automatisch bei einer Peakbreite von 0.2, einer Peakempfindlichkeit von 10 und einer Detektorempfindlichkeit von 0.1 fraktioniert. Als mobile Phase wurde ein ternäres Gemisch aus Wasser, Acetonitril und 1% TFA mit einer Flussrate von 6 mL/min verwendet. Die Eluenten

Experimenteller Teil

A (0.1% TFA in Wasser + 1% Acetonitril) und B (0.1% TFA in Acetonitril + 1% Wasser) wurden in einem linearen Gradienten verwendet.

Analytische HPLC/MS: Analytische HPLC/MS-Messungen wurden an einem Gerät der Firma *Agilent* der Serie 1100 mit einem VL-Quadrupol Massenspektrometer durchgeführt. Die Detektion der Signale erfolgte mittels eines UV-Detektors bei $\lambda = 210$ oder 260 nm. Als Trennmateriale diente eine auf 55 °C temperierte *Polaris C18 A*-Säule der Firma *Varian* (3μ , 250×4.5 mm, Porengröße 100 Å) mit einer Flussrate von 1 mL/min. Als mobile Phase diente ein binäres Lösungsmittelgemisch aus A (0.1% Ameisensäure in Wasser + 1% Acetonitril) und B (0.1% Ameisensäure in Acetonitril + 1% Wasser).

Gradient 1: 0% B \rightarrow 10% B in 20 min

Gradient 2: 3% B \rightarrow 30% B in 20 min

Gradient 3: 3% B \rightarrow 60% B in 20 min

Gradient 4: 3% B \rightarrow 70% B in 30 min

Analytische HPLC: Es wurde eine Anlage der Serie *Elite LaChrom* der Firma *Merck-Hitachi* verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor bei Wellenlängen von $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 260$ nm. Für die Experimente aus Kapitel 4.3 wurden die Signale mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors ($\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm) detektiert. Als Trennsäulen dienten auf 55 °C temperierte *RP-C18* Säulen vom Typ *A5u „Polaris“* (PN 2000-250x046) der Firma *Varian*. Zur Elution diente ein ternäres Gemisch aus Wasser, Acetonitril und 1% TFA mit einer Flussrate von 1 mL/min. Die Eluenten A (0.1% TFA in Wasser + 1% Acetonitril) und B (0.1% TFA in Acetonitril + 1% Wasser) wurden in einem linearen Gradienten verwendet.

Gradient 5: 3% B \rightarrow 30% B in 30 min

Gradient 6: 3% B \rightarrow 60% B in 30 min

Gradient 7: 3% B \rightarrow 90% B in 30 min

Analytische UPLC/MS: Für analytische UPLC/MS-Messungen wurde ein Gerät der Serie *Acquity UPLC* der Firma *Waters* verwendet. Die Detektion der Signale erfolgte mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bzw. $\lambda = 210$ nm. Als Trennsäule diente eine auf 55 °C temperierte *Waters-X-Bridge-C18-Säule* der Firma *Waters* (1.7μ , 50×2 mm) mit einer Flussrate von 1 mL/min. Als mobile Phase diente ein binäres Lösungsmittelgemisch aus A (0.1% TFA in Wasser + 1% Acetonitril) und B (0.1% TFA in Acetonitril + 1% Wasser).

Gradient 8: 3% B → 60% B in 4 min

UV-Vis-Spektroskopie: Die Messungen wurden am Gerät *Carey 100 Bio* der Firma *Varian* durchgeführt. *Bestimmung des Beladungsgrades von Fmoc-beladenen Harzen:* Ein Aliquot der DMF/Piperidin (4:1) Filtrate der Fmoc-Entschützungen wurde so verdünnt, dass mit Formel (1) eine Absorption von ca. 0.3 OD zu erwarten war. Die tatsächlich gemessene Absorption ergab den Beladungsgrad, berechnet nach folgender Formel:

$$A = \epsilon_{(300)} \cdot c \cdot d$$

A = Absorption (bei 300 nm); d = Schichtdicke der Küvette (cm); ϵ = molarer Extinktionskoeffizient bei 300 nm ($7800 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Bestimmung der Konzentration der PNA-/DNA-Stammlösungen: Zur Konzentrationsbestimmung wurde der spezifische Absorptionskoeffizient $\epsilon_{(260)}$ verwendet, der mit Hilfe der im Internet von *Applied Biosystems/Ambion* bereitgestellten Berechnungssoftware^[181] bestimmt wurde. Als Lösungsmittel diente ein mit 2 M NaOH auf pH 7.0 eingestellter Phosphat-Puffer (10 mM NaH_2PO_4 , 200 mM NaCl). Im Falle der unmarkierten sowie PEGylierten Peptid-PNA-Konjugate wurde zur Berechnung des Extinktionskoeffizienten nur die PNA-Sequenz berücksichtigt. Zur Konzentrationsbestimmung FAM-markierter Peptide oder Peptid-PNA-Konjugate wurde die Absorption des Chromophors ($\epsilon_{492} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) gemessen. Für die Bestimmung der Konzentration des Badan-markierten Peptids **62** wurde zunächst der Extinktionskoeffizient von Badan in einer wässrigen Lösung bestimmt ($\epsilon_{387} = 12075 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und dieser für die Konzentrationsbestimmung von **62** herangezogen.

Fluoreszenzspektroskopie: Für die Anisotropie- und Fluoreszenzexperimente wurde ein SPEX-FluoroMax 3 Spektrometer der Fa. *Jobin-Yvon* verwendet. Die Messungen wurden in einem Peltier-thermostatisierbaren Einfachküvettenhalter durchgeführt. Für automatische Titrationsmessungen wurde ein Hamilton 500 microlab Titrator verwendet. Die Messbedingungen sowie verwendetes Zubehör werden in den entsprechenden Versuchsdurchführungen beschrieben.

Plattenleser: Die Messungen wurden mit dem FLUOstar OPTIMA sowie POLARstar OPTIMA der Firma *BMG Labtech* durchgeführt. Die Messbedingungen und verwendeten Mikrotiterplatten werden in den entsprechenden Versuchsdurchführungen beschrieben.

6.2 Allgemeine Vorschrift für die Festphasensynthese von Peptiden und Peptid-PNA-Konjugaten

Alle manuellen Synthesen wurden in 5 mL Polyethylen-Spitzenreaktoren der Firma *MultiSynTech* (Witten) durchgeführt. Die Reaktoren waren mit Teflonfiltern (Porengröße 50 μm) und Teflonstempeln ausgestattet. Die Reaktionen wurden bei RT durchgeführt.

6.2.1 Beladung der Harze

Beladung von Rinkamid-Harz: Zunächst wurden 100 mg Rinkamid-Harz (max. Beladung 250 $\mu\text{mol/g}$) ca. 20 min in DMF quellen gelassen. *Kupplung:* Es wurde eine 0.2 M Lösung von 4 Äq. (100 μmol) der jeweiligen Fmoc-geschützten Aminosäure, 4 Äq. (100 μmol) PyBOP und 8 Äq. (200 μmol) NMM in DMF zum Harz gegeben. Nach 3 h Schütteln wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF). *Capping:* Dann wurde 5 min mit 1 mL einer Lösung von Pyridin/ Ac_2O (9:1) geschüttelt. Abschließend wurde mit 5x DMF und 10x DCM gewaschen und am Feinvakuum getrocknet. Die Beladung wurde photometrisch bestimmt.

Tabelle 8: Beladung der verwendeten Rinkamid-Harze.

Harz	verwendete Aminosäure	Beladung ($\mu\text{mol/g}$)
72a	Fmoc-Lys(Alloc)-OH	160
72b	Fmoc-Lys(Boc)-OH	160
97	Fmoc-Lys(Boc)-OH	110
103	Fmoc-Lys(Mmt)-OH	160
124	Fmoc-Gly-OH	170
125	Fmoc-Gly-OH	180
126	Fmoc-Gly-OH	100

Beladung von MBHA-Harz: Es wurden 150 mg Harz (max. Beladung 800 $\mu\text{mol/g}$) 20 min in DMF quellen gelassen, dann 2x 10 min mit DCM/DIPEA (95:5) geschüttelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF). *Kupplung:* Es wurde eine 0.2 M Lösung von 0.2 Äq. (25 μmol) Boc-Lys(Fmoc)-OH, 0.2 Äq. (25 μmol) PyBOP und 0.6 Äq. (75 μmol) NMM in DMF zum Harz gegeben und 5 h geschüttelt. Danach wurde das Harz mit 5x DMF, 5x DCM und 5x DMF gewaschen. *Capping:* Es wurde 2x 10 min mit Pyridin/ Ac_2O (9:1) geschüttelt, anschließend

Experimenteller Teil

mit 5x DMF und 10x DCM gewaschen und am Feinvakuum getrocknet. Die Beladung wurde photometrisch bestimmt.

Beladung **118**: 160 $\mu\text{mol/g}$

6.2.2 Protokolle zur manuellen Peptid-PNA-Synthese

Peptid-PNA-Synthese nach der Fmoc/Bhoc-Strategie: Für die Synthesen wurde vor- oder unbeladenes Rinkamid-Harz eingesetzt. Je nach Synthesemaßstab wurde die entsprechende Menge an Rinkamid-Harz eingewogen. Das Harz wurde 30 min in 1 mL DMF geschüttelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF). *Fmoc-Abspaltung:* nach 2x 1.5 min Schütteln mit je 500 μL DMF/Piperidin (4:1) wurde 5x mit DMF, 5x mit DCM und 5x mit DMF gewaschen. *Kupplung:* Das Harz wurde mit einer Lösung von 4 Äq. des Fmoc-geschützten PNA- oder Aminosäuremonomers, 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM in 200 μL trockenem DMF umgesetzt. Nach 30 min Schütteln wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF). *Capping:* Das Harz wurde 5 min in einer Lösung von Pyridin/ Ac_2O (9:1) geschüttelt und 5x mit DMF, 5x mit DCM und 5x mit DMF gewaschen. Die Abspaltung der Schutzgruppen und vom Trägerharz erfolgte nach dem Waschen mit 5x DMF und 10x DCM. *Abspaltung vom Trägerharz:* Das Harz wurde 2 h mit TFA/ H_2O /TIS/4 mg Cysteinmethylester (720 μL : 40 μL : 40 μL) geschüttelt. Danach wurde 2x mit je 300 μL TFA gewaschen. *Aufarbeitung:* Die vereinigten TFA-Phasen wurden am Rotationsverdampfer auf ein Fünftel des Ausgangsvolumens eingeeengt. Durch Zugabe von 1 mL Diethylether wurde das Rohprodukt gefällt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand erneut in 500 μL Diethylether aufgenommen. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Das Rohprodukt wurde je nach Ansatzgröße in 200 μL bzw. 100 μL Wasser aufgenommen. Die Aufreinigung erfolgte über präparative RP-HPLC. Von den Produktfraktionen wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck an der *Speed-Vac* entfernt oder die Proben wurden in flüssigem N_2 schockgefroren und dann gefriergetrocknet. Die Reinheit des Produktes wurde durch MALDI-TOF/MS und HPLC-Analyse oder mittels HPLC/MS überprüft.

Peptid-/PNA-Synthese nach der Boc/Z-Strategie: Für die Synthesen wurde vor- oder unbeladenes MBHA-Harz eingesetzt. Je nach Synthesemaßstab wurde die entsprechende Menge an MBHA-Harz eingewogen. Das Harz wurde 30 min in 1 mL DMF geschüttelt und anschließend gewaschen (5x DMF, 10x DCM). *Boc-Abspaltung:* Nach 5 min Schütteln mit 1 mL TFA/*m*-Kresol (95:5) wurde 10x mit DCM und 5x mit DMF gewaschen. *Kupplung:* Das Harz wurde mit einer

Experimenteller Teil

Lösung von 4 Äq. des PNA-Monomers, 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM in 200 μ L trockenem DMF umgesetzt. Nach 30 min Schütteln wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF). *Capping*: Das Harz wurde 5 min in 1 mL einer Lösung von Pyridin/ Ac_2O (9:1) geschüttelt. Abschließend wurde mit 5x DMF, 10x DCM gewaschen. *Abspaltung vom Trägerharz*: Das Harz wurde 2 h mit 1 mL TFA/TFMSA/*m*-Kresol (800 μ L : 150 μ L : 50 μ L) geschüttelt. Danach wurde 2x mit je 100 μ L TFA gewaschen. *Aufarbeitung*: Die Aufarbeitung erfolgte analog zur Fmoc/Bhoc-Strategie.

6.2.3 Automatisierte Festphasensynthese von Peptid-PNA-Konjugaten

Der Aufbau der Peptid-PNA-Oligomere wurde auf einem *ResPep-Parallel-Synthesizer* der Firma *Intavis* durchgeführt. Je nach Synthesemaßstab wurde die entsprechende Menge an Rinkamid-Harz in 350 μ L Festphasenreaktoren eingewogen. Das Harz wurde vor Synthesebeginn im Syntheseautomaten für 30 min in 200 μ L DMF gequollen und anschließend mit DMF gewaschen (2x 200 μ L). *Fmoc-Abspaltung*: Das Harz wurde für 2 min mit DMF/Piperidin (4:1, 2x 200 μ L) versetzt und mit DMF (7x 200 μ L) gewaschen. *Kupplung der Monomere*: In einem Aktivierungsgefäß wurden für 8 min PNA-Monomer/NMP (0.2 M, 40 μ L) bzw. Aminosäure/HOBt/NMP (0.3 M, 0.3 M, 40 μ L), *N*-Methylmorpholin/DMF (4 M, 12 μ L) und HCTU/NMP (0.6 M, 18 μ L) miteinander vereint. Die Lösung wurde anschließend für 30 min zum Harz gegeben und dieses anschließend mit DMF gewaschen (2x 200 μ L). *Capping*: Das Harz wurde für 3 min mit DMF/2,6-Lutidin/Essigsäureanhydrid (89:6:5, 2x 200 μ L) versetzt und mit DMF (6x 200 μ L) gewaschen. Die Abspaltung vom Harz sowie die Aufarbeitung erfolgten wie in 6.2.2 beschrieben.

6.3 Experimente zu Kapitel 4.1

6.3.1 Expression des BIR3-Proteins

Bei den Arbeiten wurde darauf geachtet, steril zu arbeiten. Die verwendeten Geräte wurden vor dem Einsatz autoklaviert oder sterilisiert. Zur Dekontamination nach den durchgeführten Arbeiten wurden die Geräte ebenfalls autoklaviert und anschließend gereinigt. Die Nährmedien wurden mit Ampicillin (Amp) aus einer Stammlösung von 50 mg/mL in Ethanol versetzt.

Plasmidtransformation (DH5 α)

Die Ca^{2+} -kompetenten *E.coli* DH5 α (200 μ L/Tube) (zur Verfügung gestellt von Saskia Neubacher, AK Arenz) wurden auf Eis aufgetaut und dann zu 100 μ L Aliquoten aufgeteilt. Zu 100 μ L

Experimenteller Teil

Zellen wurden ca. 50 ng Plasmid-DNA zugegeben und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock für 90 sec bei 42 °C im Thermoschüttler (ohne Schütteln). Die Zellen wurden sofort danach für 2 min auf Eis gekühlt. Zur Regeneration der Zellen wurden jeweils 500 µL LB (Luria-Bertani)-Medium zugesetzt und die Eppendorfgefäße für 0.5 – 1.5 h bei 37 °C und 400 rpm geschüttelt. Jeweils 10, 50 und 100 µL der Transformanten wurden auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die LB-Amp-Platten ausgewertet und auf Bakterienwachstum untersucht.

Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde ein *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Mit einer sterilen Pipettenspitze oder einer Einmal-Impföse wurden 2 mL LB-Medium (mit 50 µg/mL Ampicillin) in einem sterilen Falkongefäß mit einer Bakterienkolonie angeimpft und die Kultur bei 37 °C über Nacht im Schüttler wachsen gelassen. Aus der Übernachtskultur wurden 2 mL entnommen, durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde nach der Anleitung zum *QIAprep Miniprep Kit* behandelt und die Plasmide in H₂O isoliert.

Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Die DNA-Konzentration wurde durch photometrische Messung am *NanoDrop* über die Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei gibt die Software des Gerätes die Konzentration in ng/µL an. Das Verhältnis von OD 260 zu OD 280 ist ein Maß für Verunreinigungen mit Proteinen. Bei sauberer DNA liegt das Verhältnis bei über 1.8.

Plasmidtransformation (BL21(D3))

Es wurden kompetente BL21(D3)-Zellen der Firma *Novagen* verwendet. Die Transformation wurde nach dem Protokoll von *Novagen* durchgeführt. Die Zellen wurden bereits aliquotiert geliefert und sofort bei -80 °C aufbewahrt. Für die Transformation wurden die Zellen in 1.5 mL Eppendorfgefäßen auf Eis aufgetaut und leicht geschüttelt um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen. Anschließend wurde 1 µL der DNA-Lösungen zugegeben und leicht geschüttelt. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gelagert, dann für 30 sec bei 42 °C erhitzt und erneut für 2 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden 250 µL von SOC-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C und 400 rpm inkubiert. 5 – 50 µL der Zellkulturen wurden auf LB-Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Präparation von Glycerinkulturen

Es wurden 8 mL Glycerin mit 2 mL Millipore Wasser gemischt und autoklaviert. Weiterhin wurden 5 mL LB/Ampicillin-Medium (Endkonzentration Amp 50 µg/mL) mit Hilfe einer sterilen Impföse mit einer Kultur einer LB-Amp-Platte angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht zu einer Vorkultur herangezüchtet. Um die Konserven herzustellen wurden 0.2 mL Glycerin in einem sterilen 1.5 mL Eppendorfgefäß mit 0.8 mL der wachsenden *E.coli*-Kultur gemischt. Die Ansätze wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Proteinexpression

Zur Expression wurde der *E. coli* BL21(DE3)-Stamm eingesetzt. Dieser enthält das λDE3 Lysogen für die T7 RNA Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5* Promoters. Die Expression der T7 RNA Polymerase wird durch IPTG induziert. Der Stamm ist *lon* Protease und *outer membrane Protease* (*OmpT*) defizient, wodurch die Degradation heterologer Proteine reduziert wird. Je 5x 5 mL LB/Ampicillin-Medium (Endkonzentration Amp 50 µg/mL) wurden mit Hilfe einer sterilen Impföse aus einem Glycerolstock angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm über Nacht zu einer Vorkultur herangezüchtet. Mit diesen Vorkulturen wurden je 5x 300 mL frisches LB/Ampicillin-Medium (Endkonzentration Amp 50 µg/mL) in 1L-Erlenmeyerkolben angeimpft. Diese Hauptkulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0.7 weitergezüchtet. Diese war nach ca. 2 Stunden erreicht. Die Hauptkulturen wurden mit IPTG induziert (Endkonzentration IPTG 0.5 mM) und über Nacht bei 27 °C und 200 rpm inkubiert. Im Anschluss an die Expression wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4300 rpm abzentrifugiert, der Mediumüberstand entfernt, die Zellpellets in Puffer (10 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 7.4; 2 mL/g Zellpellet) resuspendiert und bei -20 °C eingefroren.

Gewinnung des Zelllysats

Die Zellsuspension wurde unter Schütteln bei 37 °C aufgetaut. Anschließend wurde der Proteasehemmer Pefablock (Endkonzentration 1 mM) zugegeben und die Zellen mechanisch mit einer Zellpresse (French Press, *Thermo*) aufgeschlossen (2x 1000 psi). Das Zelllysate wurde durch Zentrifugation bei 51000 rpm und 4 °C für 45 min geklärt und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Experimenteller Teil

Proteinaufreinigung

Die Proteinlösung wurde mit Imidazol versetzt (Endkonzentration 20 mM) und auf eine Ni-NTA-Säule über ein Äkta Chromatographie-System (*Amersham Biosciences*, Freiburg) aufgetragen. Tabelle 9 gibt eine Übersicht über die verwendete Methode. Es wurden HisTrapTM HP-Säulen (*Amersham Biosciences*) mit einem Volumen von 5 mL eingesetzt. Anschließend wurde mit 20 mM Imidazol in Puffer (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 7.4) gewaschen und mit 500 mM Imidazol im selben Puffer eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von 2 ml gesammelt und diese mittels MALDI-TOF auf Vorhandensein und Reinheit des gewünschten Proteins untersucht.

Tabelle 9: FPLC-Methode zur Aufreinigung des BIR3-Proteins.

Schritt	Durchführung
Beladen der Säule	Fluss 1 mL/min
Waschen der Säule	10 Säulenvolumina, Fluss 5 mL/min mit 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7.4
Elution	10 Säulenvolumina, Fluss 6 mL/min mit 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7.4
Äquilibrieren der Säule	5 Säulenvolumina, Fluss 5 mL/min mit 20 mM NaH ₂ PO ₄ , 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7.4

Zur Entfernung des Imidazols wurde eine Dialyse durchgeführt. Hierzu wurden *Slide-A-Lyzer* Dialysekassetten (*Thermo*) mit MWCO 2000 kDa verwendet. Diese wurden mit den erhaltenen Fraktionen befüllt und unter zweimaligem Pufferwechsel für ca. 18 h bei 4 °C dialysiert (Puffer: 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.4). Zur Aufkonzentrierung wurden die Dialysekassetten anschließend mit *Slide-A-Lyzer Concentrating Solution* in kleine Plastiktüten gegeben und für ca. 2 h bei 4 °C inkubiert. Dabei wurde das Volumen auf etwa die Hälfte eingeeengt. Anschließend wurden die Proteinlösungen aus den einzelnen Kassetten vereinigt und 15 min bei 65000 rpm und 4 °C zentrifugiert um auftretenden Niederschlag zu entfernen.

Nach der Zentrifugation erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration über einen Bradford-Test. Die Konzentration von 6.88 mg/ml (544 µM) des rekombinanten Proteins wurden

Experimenteller Teil

anhand einer BSA-Standardkurve berechnet. Die erhaltene Proteinlösung wurde aliquotiert (je 50 μL) und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Zunächst wurde eine Eichgerade mit bekannten Konzentrationen von BSA in Puffer (20 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.4) erstellt. Dazu wurden in Küvetten je 20 μL einer 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 und 2.0 g/L Lösung von BSA in Puffer zu 1 mL Bradford-Reagenz gegeben und die Absorption bei 595 nm gemessen. Anschließend wurden 5 μL der Proteinlösung von BIR3 in Puffer zu 1 mL Bradford-Reagenz gegeben und mittels Absorptionsmessung bei 595 nm die Konzentration errechnet.

6.3.2 Gelchromatographie

Für die Proteinanalytik wurde ein SDS-Page-Gel verwendet. *Trenngel (15%)*: 1.28 mL 40% Acrylamid, 1.3 mL 1.5 M Tris (pH 8.8), 2.32 mL H_2O , 50 μL 10% SDS, 50 μL 10% Ammoniumpersulfat, 2 μL TEMED. *Sammelgel (5%)*: 250 μL 40% Acrylamid, 250 μL 1.0 M Tris (pH 6.8), 1.48 mL H_2O , 20 μL 10% SDS, 20 μL 10% Ammoniumpersulfat, 2 μL TEMED.

Tabelle 10: Zusammensetzung der für die Gelelektrophorese verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer	Zusammensetzung
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin (pH 8.3), 0.1% (w/v) SDS
Beladungspuffer	50 mM Tris-Cl (pH 6.8), 100 mM DTT, 2% (w/v) SDS, 0.1% Bromphenolblau, 10% (v/v) Glycerin
Färbelösung	0.25 g Coomassie Brilliant Blue R-250 in 100 mL $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}$ (5:4:1)
Entfärbelösung	$\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{AcOH}$ (5:4:1)

Nach dem Gießen des Trenngels (ca. 5 mL) wurde es mit EtOH überschichtet. Dieses wurde nach beendeter Polymerisation ausgewaschen, die Oberfläche des Gels getrocknet und das Sammelgel (ca. 1 mL) aufgesetzt. Nach der Polymerisation wurden die Taschen des Gels mit Elektrophoresepuffer gewaschen. Zum Beladen wurde die entsprechende Menge Probe mit 10 μL Beladungspuffer versetzt und 5 min bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert. Danach wurden 10 μL auf das Gel

Experimenteller Teil

aufgetragen. Als Massenvergleich wurde außerdem ein Proteinmarker (SigmaMarkerTM Low Range, 6500 – 66000 Da) der Firma *Sigma Aldrich* aufgetragen. Das Gel wurde in Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 120 V für 60 min laufen gelassen. Das Gel wurde anschließend über Nacht mit Färbelösung angefärbt und am nächsten Tag mit Entfärbelösung entfärbt. Dazu wurde das Gel in einer Mikrowelle in Minutenschritten erhitzt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen ist in Tabelle 10 zusammengetragen.

6.3.3 BIR3-Bindungsassay basierend auf Fluoreszenzintensität

Messung des Fluoreszenzspektrums von **62**

Die Aufnahme des Fluoreszenzspektrums von **62** erfolgte am SPEX-FluoroMax 3 Spektrometer. Es wurden 2 μM **62** aus einer wässrigen Stammlösung in Puffer (50 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.1% BSA) in einer Küvette (Küvette Hellma 114F-004QS – 1 mL mit Magnetrührkern, Peltier-thermostatisierter Einfachküvettenhalter bei 25 °C, Rührer auf Stufe 10) vorgelegt und die Messung gestartet ($\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$; Schlitzbreite 2 nm). Anschließend wurden 8 μM BIR3 zugegeben und erneut das Fluoreszenzspektrum aufgenommen.

Bestimmung des K_D -Wertes von **62** mittels Fluoreszenzintensitäts-Assay im Plattenleser

Für die Bestimmung des K_D -Wertes für das Referenzpeptid **62** wurde dieses aus einer wässrigen Stammlösung in einer Konzentration von 2 μM in 3.5 mL Puffer (50 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.1% BSA, pH 7 bzw. 10 mM NaH_2PO_4 , 200 mM NaCl, 0.2 mM TCEP, 0.2 mg/mL BSA, pH 7) verdünnt (Lösung A). Zu dieser Lösung wurde BIR3 zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 2 μM Referenzpeptid und 50 μM BIR3 vorlag (Lösung B). In eine 384-Mikrotiterplatte (schwarz, nicht-bindend) der Firma *Greiner* wurde Lösung A vorgelegt und anschließend Lösung B so zugegeben, dass ein Endvolumen von 50 μL und BIR3-Konzentrationen von 0 – 20 μM bzw. 2 μM für **62** erhalten wurden. Dann wurde die Mikrotiterplatte mit Alufolie abgedeckt und bei 25 °C für 15 min geschüttelt. Die Mikrotiterplatte wurde im Plattenleser platziert und die Fluoreszenzintensität gemessen ($\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$). Die erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Der K_D -Wert wurde hieraus durch eine nichtlineare Regression mit GraphPad Prism (Version 4.03 für Windows) ermittelt.

Bestimmung der IC₅₀-Werte mittels Fluoreszenzintensitäts-Assay im Plattenleser

Zur Ermittlung der Affinitäten der Smac-Peptide bzw. Peptid-PNA-Konjugate zur BIR3-Domäne wurden im Plattenleser die IC₅₀-Werte bestimmt. Dafür wurde das Referenzpeptid **62** aus einer wässrigen Stammlösung in einer Konzentration von 2 µM in 2 mL Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.1% BSA, pH 7 bzw. 10 mM NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, 0.2 mM TCEP, 0.2 mg/mL BSA, pH 7) verdünnt (Lösung A). Zu dieser Lösung wurde BIR3 zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 2 µM Referenzpeptid **62** und 8 µM BIR3 vorlag (Lösung B). Die Peptide bzw. Peptid-PNA-Konjugate **58a** und **58b**, **59a - c**, **61a - 61c**, **63** und **64** wurden aus einer wässrigen Stammlösung in Lösung B gelöst, wodurch Lösung C erhalten wurde (Endkonzentration: 10 µM bzw. 100 µM). In eine 384-Mikrotiterplatte der Firma *Greiner* wurde Lösung B vorgelegt und anschließend Lösung C so zugegeben, dass ein Endvolumen von 50 µL und Konzentrationen von 0 – 16 µM für **58a** und **58b**, **59a - 59c**, **61a - 61c**, **63**, **64** bzw. 2 µM für **62** und 8 µM BIR3 erhalten wurden. Dann wurde die Mikrotiterplatte mit Alufolie abgedeckt und bei 25 °C für 15 min geschüttelt. Die Mikrotiterplatte wurde im Plattenleser platziert und die Fluoreszenzintensität gemessen ($\lambda_{em} = 380$ nm, $\lambda_{ex} = 460$ nm). Die erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden gegen die Konzentration der Kompetitoren aufgetragen und die IC₅₀-Werte hieraus durch eine nichtlineare Regression mit GraphPad Prism (Version 4.03 für Windows) ermittelt.

H-Ala-Val-Pro-Cys(Badan)-NH₂ **62**:

Es wurden 6.5 mg (5 µmol) *MBHA*-Harz (max. Beladung 800 µmol/g) eingesetzt und für 30 min in DMF quellen gelassen. Der Aufbau der Fmoc-geschützten Peptid-Sequenz erfolgte nach der Vorschrift zur automatisierten Fmoc/Bhoc-Strategie. Die Kupplung des Fluorophors erfolgte manuell, wobei nur die Hälfte des Harzes (2.5 µmol) verwendet wurde. Es wurde gewaschen (5x DMF, 10x DCM), die Trt-Schutzgruppe durch 30-minütige Behandlung des Harzes mit TFA/TIS (95:5) abgespalten und das Harz erneut gewaschen (10x DCM, 5x DMF). Es wurden 0.70 mg 6-Bromacetyl-2-dimethylaminonaphthalen (2.5 µmol, 1 Äq.) in 200 µL trockenem DMF gelöst und mit DIPEA (0.8 µL, 5 µmol, 2 Äq.) versetzt. Die Kupplungslösung wurde zum Harz gegeben und das Harz für 2 h geschüttelt. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF) und die N-terminale Fmoc-Schutzgruppe wie beschrieben abgespalten. Die Abspaltung vom Harz sowie die Aufarbeitung erfolgten wie unter 6.2.2 (PNA-Synthese nach der Boc/Z-Strategie) beschrieben. Das aufgereinigte Produkt wurde mit einer Reinheit von 91% erhalten und enthielt Verunreinigungen durch das unmarkierte Peptid und dessen Disulfid (bestimmt mittels HPLC-Analyse).

Experimenteller Teil

Ausbeute: $OD_{387} = 2.3$, 190 nmol, 7.6% (bezogen auf eine Ansatzgröße von 2.5 μmol ; $\epsilon_{387} = 12075 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

Maldi-TOF/MS (m/z): gef: 622.5, ber. für $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 622.7

HPLC: t_R : 16.0 min (Gradient 7)

$\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$ (599.74 g/mol)

H-Ala-Cys-Pro-Ile-NH₂ 63:

Es wurden 18.5 mg (5 μmol) Rinkamid-Harz (max. Beladung 270 $\mu\text{mol/g}$) eingesetzt. Der Aufbau der Peptid-Sequenz erfolgte nach der Vorschrift zur automatisierten Fmoc/Bhoc-Strategie. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte über einen Peakflächenvergleich mit **65** mittels analytischer HPLC bei 210 nm.

Ausbeute: 110 nmol, 2.0% (bezogen auf die Ansatzgröße von 5 μmol)

Maldi-TOF/MS (m/z): gef: 402.2, ber. für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 402.5

gef: 424.1, ber. für $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 424.5

HPLC: t_R : 12.9 min (Gradient 6)

$\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$ (401.52 g/mol)

H-Ala-Val-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys-cctacag-Gly-NH₂ 64:

Es wurden 12.1 mg (2 μmol) Fmoc-Gly-OH beladenes Rinkamid-Harz **124** eingesetzt. Der Aufbau der Peptid-PNA-Sequenz erfolgte nach der Vorschrift zur automatisierten Synthese nach der Fmoc/Bhoc-Strategie.

Ausbeute: $OD_{260} = 12.4$, 186 nmol, 9.3% (bezogen auf den Beladungsgrad von **124**; $\epsilon_{(260)} = 66300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

Maldi-TOF/MS (m/z): gef: 2643.7, ber. für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 2644.7

HPLC: t_R : 13.4 min (Gradient 5)

$\text{C}_{109}\text{H}_{155}\text{N}_{51}\text{O}_{29}$ (2642.22 g/mol)

6.3.4 BIR3-Bindungsassay basierend auf Fluoreszenzanisotropie

Bestimmung des K_D -Wertes von **65** mittels Fluoreszenzanisotropieassay

Die Bestimmung des K_D -Wertes des Referenzpeptids **65** erfolgte durch automatische Fluoreszenztitration mit BIR3 am SPEX FluoroMax-3 (Küvette Hellma 114F-004QS – 1 mL mit Magnetrührkern, Peltier-thermostatisierter Einfachküvettenhalter bei 25 °C, Rührer auf Stufe 10, $\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 530$ nm, Bandpass angepasst auf Fluoreszenzintensität = $1.0 \cdot 10^6$, Integrationszeit 1 s, Titrator Hamilton microlab 500 series, 1000 μL Syringe, full stroke 60 s, 100 Aliquote á 2 μL , Äquilibration 0.2 min). Zur Ermittlung des K_D -Wertes wurde das Peptid **65** aus einer wässrigen Stammlösung im Puffer (100 mM NaH_2PO_4 , 0.1 $\mu\text{g/mL}$ BSA, 0.02% NaN_3 , pH 7.5 bzw. 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl , 10 mM MgCl_2 , 0.2 mM TCEP, 0.1 mM Spermin, 0.1 mg/mL BSA, pH 7.5) gelöst (Endkonzentration 5 nM) und mit 200 μL 5 μM BIR3 titriert (100 Aliquote á 2 μL). Die erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden normalisiert und gegen die volumenkorrigierte Proteinkonzentration aufgetragen. Der K_D -Wert wurde mittels nichtlinearer Regression mit GraphPad Prism (Version 4.03 für Windows) nach folgender Gleichung ermittelt:^[182]

$$r = r_f + (r_b - r_f) \cdot \frac{R_T + K_D + P_T - \sqrt{(R_T + K_D + P_T)^2 - 4R_T P_T}}{2R_T}$$

r = gemessene Anisotropie

r_f = Anisotropie des freien Referenzpeptids

r_b = Anisotropie des vollständig gebundenen Referenzpeptids

R_T = Gesamtkonzentration des Referenzpeptids

K_D = Dissoziationskonstante

P_T = Gesamtkonzentration des Proteins

Bestimmung der IC_{50} -Werte mittels Fluoreszenzanisotropieassay

Für die Bestimmung der IC_{50} -Werte der Peptid-PNA-Konjugate wurde das Referenzpeptid **65** aus einer wässrigen Stammlösung in einer Konzentration von 5 nM in 3.5 mL Puffer (100 mM NaH_2PO_4 , 0.1 mg/mL BSA, 0.02% NaN_3 , pH 7.5 bzw. 100 mM NaH_2PO_4 , 0.1 mg/mL BSA, 0.02% NaN_3 , pH 7.5 bzw. 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl , 10 mM MgCl_2 , 0.2 mM TCEP, 0.1 mM Spermin, 0.1 mg/mL BSA, pH 7.5) gelöst und die Anisotropie gemessen. Dieser Wert entsprach der Anisotropie für das ungebundene Peptid. Zu dieser Lösung wurde aus einer

Experimenteller Teil

Stammlösung (544 μM in 20 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl , pH 7.4) BIR3 zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 5 nM Referenzpeptid und 230 nM bzw. 270 nM BIR3 vorlag (Lösung A). Die gemessene Anisotropie entspricht dem Wert für das gebundene Peptid **65**. Zur Ermittlung dieser Startkonzentrationen wurde die Anisotropie für **65** in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von BIR3 gemessen (siehe Kapitel 8.2, Abbildung 68). Stieg die Anisotropie mit steigender Proteinkonzentration nicht mehr an, wurde davon ausgegangen, dass 100% des Referenzpeptids gebunden vorlagen. Dies war für eine Konzentration von 230 nM BIR3 der Fall.

Für die Ermittlung der IC_{50} -Werte wurden die Peptid-PNA-Konjugate sowie **Ma** aus ihren wässrigen Stammlösungen mit Lösung A so verdünnt, dass Endkonzentrationen von 50 μM erreicht wurden. Es wurden 200 μL von Lösung A in einer 200 μL -Küvette vorgelegt und die Peptid-PNA-Konjugate bzw. DNA-Oligomere in steigender Konzentration (0 – 7.45 μM bzw. 0 – 14 μM) zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde die Anisotropie für die erhaltene Konzentration gemessen. Die ermittelten Werte wurden normiert und gegen den Logarithmus der Konzentration des Kompetitors aufgetragen. Die IC_{50} -Werte wurden hieraus durch nichtlineare Regression mit einem sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Modell mit GraphPad Prism Version 4.03 ermittelt.

H-Abu-Arg-Pro-Phe-Lys(FAM)-NH₂ **65**:

Es wurden 18.5 mg (5 μmol) Rinkamid-Harz (max. Beladung 270 $\mu\text{mol/g}$) eingesetzt. Der Aufbau der Peptid-Sequenz erfolgte nach der Vorschrift zur automatisierten Fmoc/Bhoc-Strategie. Die Kupplung von Fmoc-Abu-OH erfolgte nach dem Protokoll zur manuellen Festphasensynthese von Peptiden. Anschließend wurde gewaschen (5x DMF, 10x DCM) und die Mmt-Schutzgruppe durch 5-minütige Behandlung mit DCM:TIS:TFA (95:3:2) abgespalten. Das Harz wurde erneut gewaschen (10x DCM, 5x DMF). Für die Kupplung des Fluorophors wurden 28.2 mg 5(6)-Carboxyfluorescein (75 μmol , 15 Äq.) in 300 μL trockenem DMF gelöst und mit 39 mg PyBOP (75 μmol , 15 Äq.) und *N*-Methylmorpholin (16,5 μL , 150 μmol , 30 Äq.) versetzt. Die Kupplungslösung wurde zum Harz gegeben und das Harz für 3 h geschüttelt. Anschließend wurde der Kupplungsschritt wiederholt. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF) und die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe wie beschrieben abgespalten. Die Abspaltung vom Harz und die Aufarbeitung erfolgten wie unter 6.2.2 beschrieben.

Ausbeute: $\text{OD}_{490} = 69.4$, 0.90 μmol , 17% (bezogen auf die Ansatzgröße von 5 μmol ; $\epsilon_{492} = 78000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

Experimenteller Teil

Maldi-TOF/MS (m/z): gef: 990.0, ber. für $[M+H]^+$: 990.1

HPLC: t_R : 6.3 min (Gradient 6)

$C_{49}H_{56}N_{10}O_{11}$ (989.08 g/mol)

H-cctacag-Gly-NH₂ **66**:

Für die Synthese von **66** wurden 11 mg Fmoc-Gly-OH beladenes Rinkamid-Tentagel-Harz **125** verwendet. Die Synthese erfolgte entsprechend dem Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese nach der Fmoc/Bhoc-Strategie (Kapitel 6.2.3).

Ausbeute: $OD_{260} = 37.1$, 0.56 μmol , 28% (bezogen auf den Beladungsgrad von **125**; $\epsilon_{(260)} = 66300 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

ESI/MS (m/z): gef: 968.5, ber. für $[M+2H]^{2+}$: 968.4

HPLC/MS: t_R : 4.8 min (Gradient 2)

$C_{76}H_{98}N_{42}O_{21}$ (1934.79 g/mol)

6.4 Experimente zu Kapitel 4.2

6.4.1 Reaktionsverfolgung am Plattenleser

Die Experimente zur Verfolgung der Transferreaktion in Gegenwart von BIR3 und **65** wurden in 384-Mikrotiterplatten (schwarz, nicht-bindend, *Greiner*) durchgeführt. Je *Well* wurden 5 nM des Referenzpeptids **65** und 230 nM BIR3-Protein in Puffer (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 0.2 mM TCEP, 0.1 mM Spermin, 0.1 mg/mL BSA, pH 7.5) vorgelegt und die Edukte **58a** (2 Äq. bezogen auf **59a** bzw. **59b**) und **59a** bzw. **59b** (2 – 4 μM) in Gegenwart von 1 Äq. oder 0.5 Äq. des komplementären DNA-Templats **Ma** oder der fehlgepaarten DNA **Mi** oder keine DNA wurden zugegeben, so dass ein Endvolumen von 80 μL erhalten wurde. Zur Bestimmung des Anisotropiewertes für 0% gebundenes Peptid **65** wurde eine Lösung von 5 nM **65** in Puffer und zur Bestimmung von 100% gebundenem Peptid **65** eine Lösung von 5 nM **65** und 230 nM BIR3 in der gleichen Mikrotiterplatte vermessen. Die Platte wurde im Plattenleser platziert und die Messung gestartet ($\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$).

6.4.2 Reaktionsverfolgung am Fluoreszenzspektrometer

Die Verfolgung der Transferreaktion erfolgte am *SPEX FluoroMax-3*. Es wurde ein Puffer (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 0.1 mM Spermin, 0.1 mg/mL BSA, 10 mM MgCl_2 , 0.2 mM TCEP) hergestellt und mit 2 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt. Zunächst wurde das Referenzpeptid **65** aus einer wässrigen Stammlösung (4.4 mM) in einer Konzentration von 5 nM in 3.5 mL Puffer gelöst und die Fluoreszenzanisotropie gemessen. Dieser Wert entsprach der Anisotropie für das freie Peptid. Zu 3 mL dieser Lösung wurde BIR3 zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 5 nM Referenzpeptid **65** und 230 nM BIR3 vorlag (Lösung A). Die gemessene Anisotropie entsprach derjenigen für das gebundene Peptid. Anschließend wurden in einer 200 μL Küvette 198 μL Lösung A vorgelegt und das Thiol **59a** sowie der Thioester **58a** aus ihren wässrigen Stammlösungen so zugeben, dass eine Endkonzentration von 10 μM für das Thiol und 20 μM für den Thioester vorlag. Dazu wurde das DNA-Templat **Ma** gegeben (Endkonzentration 5 μM) und die Anisotropiemessung gestartet.

6.4.3 Reaktionsverfolgung mittels HPLC

Es wurden 2 Puffer hergestellt und jeweils mit 2 M NaOH auf pH 7.5 eingestellt.

Puffer A: 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 0.1 mM Spermin, 0.1 mg/mL BSA, 10 mM MgCl_2

Puffer B: 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 0.1 mM Spermin, 0.1 mg/mL BSA, 10 mM MgCl_2 , 0.4 mM TCEP

Für die Untersuchung der Reaktionskinetik wurde aus der wässrigen Stammlösung von Thiol **59a** (1.2 mM) durch Verdünnung mit Puffer B eine Reaktionslösung mit einer Konzentration von 2 μM hergestellt und diese 20 min bei 25 °C geschüttelt, um eventuell vorhandene Disulfide zu reduzieren. Anschließend wurde die Lösung auf Eis aufbewahrt. Aus der wässrigen Stammlösung von Thioester **58a** (0.7 mM) wurde durch Verdünnung mit Puffer A eine Reaktionslösung mit einer Konzentration von 4 μM hergestellt und auf Eis aufbewahrt. Anschließend wurden die Reaktionslösungen so zusammengegeben, dass eine Endkonzentration von 1 μM Thiol, 0.2 mM TCEP, und 2 μM Thioester vorlag. Dazu wurde das DNA-Templat **Ma** gegeben (Endkonzentration 1 μM) und die gewünschte Zeit geschüttelt. *HPLC-Analyse*: Es wurden Aliquote (100 μL) entnommen, mit TFA (2 μL) versetzt und mittels analytischer HPLC untersucht (siehe auch Anhang 8.1).

Experimenteller Teil

Da der Thioester **58a** im Überschuss eingesetzt wurde, erfolgte die Bestimmung der Ausbeute von **61a** anhand des Umsatzes von **59a** über Peakflächenvergleich nach folgender Formel:

$$\eta_{61a} = \frac{PF_{61a}}{PF_{59a} + PF_{61a}} \cdot 100\%$$

mit η = Ausbeute; PF_{61a} = Peakfläche von **61a**; PF_{59a} = Peakfläche von **59a**.

H-Abu-Arg-Pro-Phe-Lys-NH₂ **71**:

Die Synthese von **71** folgte dem Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese von Peptid-PNA-Konjugaten (Kapitel 6.2.3). Es wurden 18.5 mg (5 μ mol) Rinkamid-Harz (max. Beladung 270 μ mol/g) eingesetzt. Die Reinheit und Identität des Peptids **71** wurde mittels HPLC/MS überprüft. Allerdings wurde das Peptid trotz Wahl des flachen Gradienten 1 sehr früh eluiert und die Reinheit konnte nicht eindeutig bestimmt werden.

Ausbeute: $OD_{260} = 0.3$; 1.8 μ mol, 36% (bezogen auf die Ansatzgröße von 5 μ mol; $\epsilon_{(260)} = 144 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)^[183]

ESI/MS (m/z): gef: 631.3, ber. für $[M+H]^+$: 631.8

HPLC/MS: t_R : 2.4 min (Gradient 1)

$C_{30}H_{50}N_{10}O_5$ (630.78 g/mol)

6.5 Experimente zu Kapitel 4.3

6.5.1 Synthese von fluoreszenzmarkierten Peptid-PNA-Konjugaten

Zur Synthese der fluoreszenzmarkierten Peptid-PNA-Konjugate wurde die gewünschte Peptid-PNA-Sequenz nach den in 6.2.3 beschriebenen Protokollen am *ResPep-Synthesizer* aufgebaut. Zur Anbindung des Fluorophors wurde ein an der Seitenkette orthogonal geschützter Lysin-Baustein eingeführt. Als Seitenschutzgruppe diente die Allyloxycarbonyl-(Alloc)-Schutzgruppe. Nach dem Aufbau der Fmoc-geschützten Peptid-PNA-Sequenz wurde das Harz in einen Spritzenreaktor für die manuelle Festphasensynthese überführt. Alle weiteren Syntheseschritte erfolgten manuell. *Alloc-Abspaltung*: Das Harz wurde zunächst mit einer Lösung von 1.5 mg Dimethylbarbitursäure (12 μ mol, 6 Äq.) in trockenem, entgastem DCM versetzt. Anschließend wurde eine Lösung von 2.3 mg $Pd(PPh_3)_4$ (2 μ mol, 1 Äq.) in trockenem, entgastem DCM hinzugefügt und für 30 min

Experimenteller Teil

geschüttelt. Dies wurde ein weiteres Mal wiederholt und das Harz anschließend gewaschen (3x DCM, 3x DMF, 5x Dioxan:H₂O (9:1), 3x MeOH, 3x DMF). *Fluorophor-Kupplung*: 4.5 mg 5(6)-Carboxyfluorescein (12 μ mol, 6 Äq.) wurden in 200 μ L trockenem DMF gelöst und mit 6.2 mg PyBOP (12 μ mol, 6 Äq.) und 2.64 μ L *N*-Methylmorpholin (24 μ mol, 12 Äq.) versetzt. Die Kupplungslösung wurde zum Harz gegeben und das Harz für 3 h geschüttelt. Anschließend wurde die Kupplung wiederholt. Vor der Freisetzung vom polymeren Träger wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 10x DCM). *Freisetzung vom polymeren Träger und Aufreinigung*: Das Harz wurde für 1.5 h mit 1 mL TFA:Wasser:TIS:*m*-Kresol (85:5:5:5) geschüttelt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Kapitel 6.2.2 beschrieben. *Fmoc-Abspaltung und zweite HPLC-Aufreinigung*: Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurde das trockene Produkt in 30 μ L ACN gelöst, mit 100 μ L Piperidin:Wasser (1:1) versetzt und 3 min geschüttelt. Anschließend wurden unter Eiskühlung 100 μ L TFA vorsichtig zugegeben. Das Produkt wurde durch Zugabe von kaltem Diethylether gefällt und abzentrifugiert. Der ölige Rückstand wurde erneut in 50 μ L TFA aufgenommen und mit kaltem Diethylether gefällt. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis ein fester Niederschlag erhalten wurde. Dieser wurde in 200 μ L Wasser gelöst und erneut mittels semi-präparativer RP-HPLC aufgereinigt. Die Reinheit des erhaltenen Produktes wurde durch HPLC/MS-Analyse überprüft.

H-Ala-Cys-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys-cctacag-Lys(FAM)-NH₂ **76a**:

Dem Protokoll zur Synthese von fluoreszenzmarkierten Peptid-PNA-Konjugaten folgend wurden 13 mg **72a** (2 μ mol) eingesetzt, die Aminosäuresequenz am Synthesautomaten aufgebaut und manuell fluoreszenzmarkiert. Der Ansatz wurde vor der zweiten HPLC-Aufreinigung geteilt und nur 1/3 des Rohproduktes weiter verwendet. Das Produkt **76a** konnte allerdings nur mit einer Reinheit von 90% erhalten werden (bestimmt mittels HPLC-Analyse).

Ausbeute: OD₄₉₂ = 2.3, 30 nmol, 4.5% (bezogen auf den Beladungsgrad von **72a**; $\epsilon_{(492)} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

ESI/MS (*m/z*): gef: 770.1, ber. für [M+4H]⁴⁺: 769.8

HPLC: *t_R*: 8.7 min (Gradient 3)

C₁₃₂H₁₇₀N₅₂O₃₅S (3075.28 g/mol)

Experimenteller Teil

H-Ala-Cys-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys(FAM)-cctacag-Lys-NH₂ **76b**:

Die Synthese von **76b** erfolgte nach den beschriebenen Protokollen zur automatisierten Festphasensynthese und von fluoreszenzmarkierten Peptid-PNA-Konjugaten. Dazu wurden 13 mg **72b** (2 μ mol) verwendet. Vor der zweiten HPLC-Aufreinigung wurde der Ansatz geteilt und nur die Hälfte des Rohproduktes aufgereinigt.

Ausbeute: OD₄₉₂ = 7.5; 96.7 nmol, 9.7% (bezogen auf den Beladungsgrad von **72b**; $\epsilon_{(492)} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

ESI/MS (m/z): gef: 770.1, ber. für $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$: 769.8

HPLC/MS: t_R : 9.5 min (Gradient 3)

C₁₃₂H₁₇₀N₅₂O₃₅S (3075.28 g/mol)

H-Ala-Cys-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys(FAM)-NH₂ **80**:

Zur Synthese von **80** wurden 10 mg (2.5 μ mol) Rinkamid-Tentagel-Harz (max. Beladung 250 μ mol/g) verwendet. Das Harz wurde ohne Vorbeladung in der automatisierten Peptid-Synthese nach dem Protokoll zur automatisierten Synthese von Peptid-PNA-Konjugaten eingesetzt. Dabei wurde zuerst Fmoc-Lys(Mmt)-OH gekuppelt. Nach der letzten Kupplung wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 10x DCM) und die Mmt-Schutzgruppe durch 5-minütige Behandlung mit DCM:TIS:TFA (93:5:2) abgespalten. Das Harz wurde erneut gewaschen (10x DCM, 5x DMF) und anschließend 2x mit 4 Äq. FAM, 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM je 1 h geschüttelt. Es wurde mit 5x DMF, 10x DCM gewaschen. Zur Freisetzung des Produktes wurde das Harz 1.5 h mit TFA/*m*-Kresol/H₂O/TIS (85:5:5:5) geschüttelt und anschließend mit 2x 0.2 mL TFA extrahiert. Die vereinigten Abspaltlösungen wurden dem Protokoll zur Aufreinigung von Peptid-PNA-Konjugaten folgend aufgearbeitet, dabei wurde nur 1/3 des Rohproduktes verwendet.

Ausbeute: OD₄₉₂ = 1.8; 23 nmol, 2.8% (bezogen auf die Ansatzgröße von 2.5 μ mol; $\epsilon_{(492)} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

ESI/MS (m/z): gef: 1087.3, ber. für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1088.2

HPLC/MS: t_R : 11.4 min (Gradient 3)

C₅₂H₆₆N₁₀O₁₄S (1087.20 g/mol)

H-Ala-Cys-Pro-Ile-*aecc*-Lys-cctacag-Lys(FAM)-NH₂ **81**:

Zum Aufbau von **81** wurden 13 mg **72a** (2 µmol) eingesetzt. Der Aufbau der Peptid-PNA-Sequenz erfolgte nach der Vorschrift zur automatisierten Fmoc/Bhoc-Strategie. Die Abspaltung der Alloc-Schutzgruppe sowie Kupplung des FAM erfolgten nach dem Protokoll zur Synthese von fluoreszenzmarkierten Peptid-PNA-Konjugaten. Dabei wurde der Ansatz vor der zweiten HPLC-Aufreinigung geteilt und nur 1/3 des Rohproduktes weiter verwendet.

Ausbeute: OD₄₉₂ = 3.0; 38.5 nmol, 5.5% (bezogen auf den Beladungsgrad von **72a**; $\epsilon_{(492)} = 78000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

ESI/MS (m/z): gef: 756.6, ber. für $[M+4H]^{4+}$: 756.3

HPLC/MS: t_R : 9.2 min (Gradient 3)

C₁₃₀H₁₆₈N₅₀O₃₅S (3021.26 g/mol)

6.5.2 HeLa-Zellkulturen

HeLa-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Arenz (Humboldt-Universität zu Berlin) erhalten und in unbeschichteten Kultur-Flaschen in Medium, bestehend aus DMEM mit 10% FCS, 1% Penicillin und Streptomycin (10000 U/ml), gehalten. Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

6.5.3 Gewinnung von HeLa-Zelllysat

Es wurden zunächst HeLa-Zellen aus einer 5 mL-Kultur geerntet. Dafür wurde das Nährmedium DMEM abgesaugt und die Zellen mit 1 mL PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µL Trypsin (0.25%) behandelt und 2 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in 1 mL PBS-Puffer aufgenommen und 1% Triton-X-100 zugegeben. Zur Zelllyse wurden die Zellen 45 min auf Eis gelagert und anschließend Membranfragmente durch Ultrazentrifugation (19000 rpm, 20 min, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und geteilt (2x 500 µL) und das Zelllysat für Untersuchungen verwendet oder bei -80 °C aufbewahrt.

6.5.4 Untersuchung der Stabilität in Zelllysat

Zu je 500 µL Zelllysat wurden die Peptid-PNA-Konjugate **76a**, **76b**, **80** und **81** so zugegeben, dass eine Endkonzentration von 2 µM erhalten wurde. Die Lysate wurden bei 25 °C geschüttelt

Experimenteller Teil

und es wurden Aliquote von 100 μL entnommen. Diese wurden mit 2 μL TFA versetzt und in flüssigem N_2 schockgefroren. Zur Vorreinigung wurden die Aliquote aufgetaut und sofort mittels Sepac gereinigt (60% ACN, 0.1% TFA in Wasser). Die Fraktionen wurden lyophilisiert und in 100 μL Wasser vereinigt. Anschließend erfolgte die Analytik mittels analytischer HPLC.

6.5.5 Synthese von Smac-Peptiden mit D-Aminosäuren

H-D-Ala-D-Cys-L-Pro-D-Phe-D-Gly-NH₂ 84:

Es wurden 19.4 mg (2 μmol) des Fmoc-Gly-beladenen Harzes **126** eingesetzt. Der Aufbau der Peptidsequenz erfolgte nach der Vorschrift zur automatisierten Fmoc/Bhoc-Strategie. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte über einen Peakflächenvergleich mit **65** mittels analytischer HPLC bei 210 nm.

Ausbeute: 85.0 nmol, 4.2% (bezogen auf den Beladungsgrad von **126**)

ESI/MS (m/z): gef: 493.4, ber. für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 493.2

UPLC: t_R : 1.14 min (Gradient 8)

$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$ (492.22 g/mol)

H-D-Phe-L-Cys-L-Val-L-Ala-L-Gly-NH₂ 85:

Es wurden 19.4 mg (2 μmol) des Fmoc-Gly-beladenen Harzes **126** eingesetzt. Der Aufbau der Peptidsequenz erfolgte nach der Vorschrift zur automatisierten Fmoc/Bhoc-Strategie. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgte über einen Peakflächenvergleich mit **65** mittels analytischer HPLC bei 210 nm.

Ausbeute: 80.0 nmol, 4.0% (bezogen auf den Beladungsgrad von **126**)

ESI/MS (m/z): gef: 495.4, ber. für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 495.7

UPLC: t_R : 1.08 min (Gradient 8)

$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$ (494.23 g/mol)

H-D-Phe-L-Cys-D-Val-D-Ala-L-Gly-NH₂ 86:

Es wurden 19.4 mg (2 μmol) des Fmoc-Gly-beladenen Harzes **126** eingesetzt. Der Aufbau der Peptid-Sequenz erfolgte nach der Vorschrift zur automatisierten Fmoc/Bhoc-Strategie. Die Be-

Experimenteller Teil

stimmung der Ausbeute erfolgte über einen Peakflächenvergleich mit **65** mittels analytischer HPLC bei 210 nm.

Ausbeute: 60.0 nmol, 3.0% (bezogen auf den Beladungsgrad von **126**)

ESI/MS (m/z): gef: 495.4, ber. für $[M+H]^+$: 495.7

UPLC: t_R : 1.21 min (Gradient 8)

$C_{18}H_{32}N_6O_5S$ (494.23 g/mol)

6.5.6 IC₅₀-Messungen im Plattenleser

Es wurden 5 nM **65** und 230 nM BIR3 in Puffer (100 mM NaH_2PO_4 , 0.2 mM TCEP, 100 μ g/mL BSA, pH 7.5) gelöst (Lösung A). Dabei war das Referenzpeptid 100% gebunden. Eine Lösung von 5 nM **65** in Puffer entsprach 0% gebundenem Referenzpeptid. Zu Lösung A wurden in einer 384-Mitrotiterplatte (schwarz, nicht-bindend, *Greiner*) steigende Konzentrationen von **84** - **86** (0 μ M - 7.4 μ M) zugegeben, so dass ein Endvolumen von 80 μ L erreicht wurde. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte für 15 min im Thermoschüttler bei 25 °C inkubiert und daraufhin im Plattenleser platziert und die Fluoreszenzanisotropie gemessen (λ_{ex} = 485 nm, λ_{em} = 520 nm). Dabei wurde der gerätespezifische *gain* so eingestellt, dass für das freie Referenzpeptid **65** ein Wert von 23 mP erhalten wurde. Die ermittelten Werte wurden gegen den Logarithmus der Peptid-PNA-Konjugat-Konzentration aufgetragen. Die IC₅₀-Werte wurden hieraus durch nichtlineare Regression mit einem sigmoidalen Dosis-Wirkungs-Modell mit GraphPad Prism Version 4.03 ermittelt. Für jedes Peptid wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

6.6 Experimente zu Kapitel 4.4

Alle Messungen zur Caspase-Aktivität wurden in schwarzen, nicht-bindenden 384-Mikrotiterplatten von *Greiner* durchgeführt. Nach Zugabe der Caspase-Substrate Ac-LEHD-AFC **87** bzw. Ac-DEVD-AFC **91** zu den entsprechenden Reaktionslösungen wurde die Mikrotiterplatte sofort im Plattenleser platziert und die Fluoreszenzintensität über die Zeit gemessen (λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 485 nm). Es wurde ein Messpunkt pro Minute aufgenommen. Ein Durchmischen der Proben wurde durch 15-sekündiges Schütteln der Platte im Plattenleser vor Aufnahme jedes Messpunktes erreicht.

6.6.1 Caspase-Assay mit kommerziell erhältlichem Kit

Es wurde das *Caspase-9 Inhibitor Drug Screening Kit* der Firma *BioVision* verwendet. Darin enthalten sind 10 mL 2x-Reaktionspuffer unbekannter Zusammensetzung, 500 μL 1 mM Lösung des Caspase-9 Substrates Ac-LEHD-AFC **87**, 100 μL 1 M DTT, 10 μL 2 mM Lösung von Z-VAD-FMK **90** und 100 U aktive Caspase-9. Diese wurde lyophilisiert geliefert, in 550 μL 2x Reaktionspuffer aufgenommen (im Weiteren bezeichnet als: Caspase-9-Mix), aliquotiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Anpassung des Assay-Protokolls: *Probenvorbereitung:* Es wurden a) 50 μL H_2O oder b) 49 μL H_2O und 1 μL **90** (Konzentration **90** im *Well*: 40 μM) in die *Wells* pipettiert und jeweils 5 μL (1 U) des Caspase-9-Mix zugegeben. Desweiteren wurde eine Verdünnungsreihe (0.03 U – 1U Caspase-9) der Caspase-9 durch kontinuierliche Verdünnung des angegebenen Volumens mit 2x-Reaktionspuffer erhalten. Demnach entsprechen 5 μL Caspase-9 laut Assay 1 U. Es wurden 0.5 U durch Zugabe von 5 μL Reaktionspuffers erhalten usw.. Zur Hintergrundkontrolle wurden 5 μL H_2O statt Caspase-9-Mix verwendet. *Herstellung der Substratlösung (Master Mix):* Es wurden zwei Pufferzusammensetzungen untersucht:

Puffer I: 990 μL 2x Reaktionspuffer + 10 μL 1 M DTT (Endkonzentration DTT: 10 mM)

Puffer II: 990 μL 2x Reaktionspuffer + 10 μL 20 mM TCEP in 100 mM NaH_2PO_4 (pH 7.4) (Endkonzentration TCEP: 0.2 mM)

Je 45 μL von Puffer I oder Puffer II wurden mit 5 μL der 1 mM Lösung von **87** gemischt, wobei eine Konzentration für **87** von 0.1 mM erhalten wurde. *Messung der Caspase-9-Aktivität:* Je 50 μL des jeweiligen *Master Mix* wurden zu den Proben in den *Wells* zugegeben und die Fluoreszenzmessung gestartet.

Inhibierung der Caspase-9 mit BIR3: *Probenvorbereitung:* Es wurde eine Konzentrationsreihe von BIR3 in Wasser (0 μM – 272 μM) hergestellt. Je 25 μL dieser Lösungen wurden in *Wells* pipettiert. Dazu wurden 2.5 μL des Caspase-9-Mix (0.5 U) oder 2.5 μL eines 1:1 Gemisches des Caspase-9-Mix mit 2x Reaktionspuffer (0.25 U) gegeben und mit Hilfe der Pipette gut durchmischt. Eine Hintergrundkontrolle wurde durch Weglassen der Caspase-9 erhalten, eine Positivkontrolle ergab sich durch Zugabe von 1 μL Caspase-9-Inhibitor **90** anstelle von BIR3. *Herstellung der Substratlösung (Master Mix):* Es wurde ein *Master Mix* hergestellt, indem 24.5 μL Puffer II mit 0.5 μL der 1 mM Lösung von **87** gemischt wurden (Konzentration **87**: 20 μM). *Messung der Caspa-*

Experimenteller Teil

se-9-Aktivität: Je 25 μL der *Master Mix* Lösung wurden jeweils zu den Proben zugegeben, die Lösungen gut durchmischt und die Fluoreszenzmessung gestartet.

Active Site Titration: *Probenvorbereitung:* Je 25 μL von **90** in H_2O (0 μM – 3 μM) wurden in *Wells* pipettiert und je 2.5 μL des Caspase-9-Mix (0.5 U) zugegeben. *Herstellung der Substratlösung (Master Mix):* Es wurde ein *Master Mix* hergestellt, indem 24.5 μL Puffer II mit 0.5 μL der 1 mM Lösung von **87** gemischt wurden (Konzentration **87**: 20 μM). *Messung der Caspase-9-Aktivität:* Je 25 μL der *Master Mix* Lösung wurden jeweils zu den Proben zugegeben, die Lösungen gut durchmischt und die Fluoreszenzmessung gestartet.

6.6.2 Caspase-Assay mit Citrat-Puffer

Untersuchung der Aktivierungszeit: *Probenvorbereitung:* In die *Wells* von 384-Mikrotiterplatten wurde Citrat-Puffer (1 M Na-Citrat, 50 mM NaH_2PO_4 , 0.2 mM TCEP, 0.05% CHAPS, pH 7.4) vorgelegt und anschließend Caspase-9 aus dem Caspase-9-Mix so zugegeben, dass Endkonzentrationen bzw. Enzymeinheiten für die Caspase-9 von 20 nM – 40 nM bzw. 0.125 U – 0.5 U erhalten wurden. Die Mikrotiterplatten wurden abgedeckt und im Thermoschüttler bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Nach den angegebenen Aktivierungszeiten wurden die Platten aus dem Thermoschüttler entnommen und die Caspase-9-Aktivität gemessen. *Herstellung der Substratlösung (Master Mix):* Es wurde ein *Master Mix* hergestellt, indem 24.2 μL Citrat-Puffer mit 0.75 μL der 1 mM Lösung von **87** gemischt werden (Konzentration **87**: 30 μM). *Messung der Caspase-9-Aktivität:* Je 25 μL der *Master Mix* Lösung wurden jeweils zu den Proben zugegeben, die Lösungen gut durchmischt und die Fluoreszenzmessung gestartet.

Inhibierung mit BIR3: *Probenvorbereitung:* Es wurde eine Konzentrationsreihe von BIR3 in Citrat-Puffer (0 μM – 100 μM) hergestellt. Je 25 μL dieser Lösungen wurden in *Wells* pipettiert. Dazu wurden 2.5 μL des Caspase-9-Mix (0.5 U) gegeben und mit Hilfe der Pipette gut durchmischt. Die Mikrotiterplatten wurden abgedeckt und im Thermoschüttler bei 37 °C, für 1.5 h und bei 250 rpm inkubiert. *Herstellung der Substratlösung (Master Mix):* Es wurden je 24.2 μL Citrat-Puffer mit 0.75 μL der 1 mM Lösung von **87** gemischt (Konzentration **87**: 30 μM). *Messung der Caspase-9-Aktivität:* Je 25 μL der *Master Mix* Lösung wurden jeweils zu den Proben zugegeben, die Lösungen gut durchmischt und die Fluoreszenzmessung gestartet.

6.6.3 Caspase-Assay in Zelllysat

HEK293-Zellkulturen: HEK293-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Arenz (Humboldt-Universität zu Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit DMEM versetzt mit 1% einer Penicillin-Streptomycin Mischung sowie 10% fetalem Rinderserum bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

Gewinnung des Zelllysats: Die Ernte der Zellen erfolgte bei 90% Konfluenz. Dazu wurden die Zellen durch Waschen mit eiskaltem PBS-Puffer von der Wand der Zellkulturflaschen gelöst und pelletiert (5 min, 200 x g, 4 °C). Das Pellet wurde mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und die Zellen erneut pelletiert (5 min, 200xg, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet im doppelten Volumen mit Puffer (20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM TCEP, pH 7.4) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Das Aufschließen der Zellen erfolgte durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 23G-Kanüle. Das Zelllysate wurde durch Zentrifugation bei 16000 x g und 4 °C für 30 min geklärt. Der Überstand wurde sofort für die weiteren Experimente verwendet oder bei -80 °C aufbewahrt.

Untersuchung der Caspase-9/-3-Aktivität in Zelllysate: *Caspase-Aktivierung:* Das Zelllysate wurde mit Puffer (20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 5 mM EDTA, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM TCEP, pH 7.4) verdünnt und mit 10 µM CytC (Negativkontrolle ohne CytC) und 2 mM ATP versetzt. Je 25 µL wurden in *Wells* einer 384-Mikrotiterplatte pipettiert und für 30 min bei 37 °C und 250 rpm im Thermoschüttler inkubiert. *Inhibierung mit BIR3:* Zur Inhibierung der Caspase-9 wurde rekombinantes BIR3-Protein (Endkonzentration 0 nM – 500 nM) zupipettiert (Endvolumen 25 µL) und ebenfalls 30 min bei 37 °C inkubiert. *Reaktivierung mit Transferprodukt:* Zur Untersuchung der antagonistischen Wirkung der Peptid-PNA-Konjugate **61a** und **61b** wurden diese aus wässrigen Stammlösungen (Endkonzentration 0 µM – 10 µM) zusammen mit BIR3-Protein (50 nM – 100 nM) zum Zelllysate in Puffer gegeben und wie oben beschrieben inkubiert. *Reaktivierung der Caspase-9 durch in situ generierte Peptid-PNA-Konjugate:* Die antagonistische Wirkung der *in situ* generierten Peptid-PNA-Konjugate **61a** und **61b** wurde durch Zugabe der Edukt-Konjugate der Transferreaktion **58a**, **59a** und **59b** (Endkonzentration für **58a** 4 µM, für **59a** und **59b** 2 µM) in Anwesenheit von 1 Äq. oder 0.5 Äq. komplementärer DNA **Ma** oder einzelbasenfehlgepaarter DNA **Mi** oder in Abwesenheit von DNA untersucht. *Herstellung der Substratlösung (Master Mix):* Es wurden je 24.5 µL Puffer mit 0.5 µL einer 5 mM Lösung von **87** in DMSO oder mit 0.5 µL einer 5 mM Lösung von **91** in DMSO gemischt (Konzentration **87**, **91**: 100 µM). *Messung der Caspase-9-*

Aktivität: Je 25 μL der *Master Mix* Lösung wurden jeweils zu den Proben zugegeben, die Lösungen gut durchmischt und die Fluoreszenzmessung gestartet.

6.7 Experimente zu Kapitel 4.5

6.7.1 Versuche zur Konjugation mit dem polydispersen PEG-Succinimidylester **102**

In Lösung: Es wurden 7.5 mg (2 μmol) des mit Fmoc-Lys(Boc)-beladenen Rinkamid-Harzes **97** eingesetzt. Zunächst wurde die Fmoc-geschützte Peptid-PNA-Sequenz **98** nach dem in 6.2.3 beschriebenen Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese von Peptid-PNA-Konjugaten aufgebaut. Anschließend wurde das Harz geteilt. Zur Generierung der Fmoc-freien Sequenz **99** wurde ein Teil des Harzes für 2x 2min mit Piperidin/DMF (1:4) geschüttelt und dann gewaschen (5x DMF, 10x DCM). Für den zweiten Teil des Harzes entfiel diese Behandlung und es folgte sogleich die Freisetzung von der festen Phase, um **100** zu erhalten. Die Abspaltung vom Harz sowie die Aufarbeitung erfolgten wie in 6.2.3 beschrieben. Zur Kupplung des PEGOSu **102** wurden 50 nmol der aufgereinigten Peptid-PNA-Chimäre **99** in 250 μL eines entgasten 0.1 M Tris-HCl-Puffers (pH 8.5) gegeben und 50 nmol (1 Äq.) von **102** in 250 μL Puffer zusammengegeben, so dass eine Endkonzentration von 0.1 mM für **99** und **102** erhalten wurde. Die Reaktionsmischung wurde bei 25 °C für 16 h schütteln gelassen. Die Reaktionskontrolle erfolgte mittels MALDI-TOF/MS. Dazu wurden nach verschiedenen Zeiten 1 μL Aliquote entnommen und analysiert. Zu dem Fmoc-geschützten Konjugat **100** (100 nmol) wurden 25 μL des entgasten 0.1 M Tris-HCl Puffers (pH 8.5) und 250 nmol (5 Äq.) von **102** in 25 μL Puffer, sowie 50 μL ACN zugegeben, so dass eine Endkonzentration für **100** von 1 mM und für **102** von 5 mM erhalten wurde. Die Reaktionsmischungen wurden bei 25 °C für 16 h schütteln gelassen und die Reaktionskontrolle erfolgte wie oben beschrieben.

An der festen Phase: Es wurden 12.5 mg (2 μmol) des mit Fmoc-Lys(Mmt)-OH beladenen Rinkamid-Harzes **103** eingesetzt. Anschließend wurde die Fmoc-geschützte Sequenz **104** am Harz nach dem in 6.2.3 beschriebenen Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese von Peptid-PNA-Konjugaten aufgebaut und das Harz gewaschen (10x DCM). Zur Entfernung der Mmt-Schutzgruppe wurde das Harz mit einer Mischung von DCM:TIS:TFA (94:5:1) behandelt (2x 2 min) und anschließend erneut gewaschen (10x DCM, 5x DMF). Dann wurden je 20 mg **102** (10 μmol , 5 Äq.) bzw. 5 μL DIPEA (30 μmol , 15 Äq.) in 100 μL DMF gelöst. Es wurde erst die Lösung mit DIPEA zum Harz gegeben und anschließend die Lösung von **102** in DMF dazugegeben und für 1 h geschüttelt. Dann wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 10x DCM) und eine

kleine Menge Harz für eine Testabspaltung verwendet. Dazu wurde diese in einem Eppendorfgefäß in 100 µL TFA mit TIS, H₂O und CysOMe (85:5:5, 0.5 mg) versetzt und 1 h schütteln gelassen. Die Lösung wurde am Vakuum eingeeengt und das Rohprodukt durch Zugabe von 1 mL Diethylether gefällt und abzentrifugiert. Das getrocknete Rohprodukt wurde in 50 µL H₂O aufgenommen und mittels MALDI-TOF/MS untersucht. Da keine Produktbildung nachgewiesen werden konnte, wurde das restliche Harz für einen weiteren PEGylierungsversuch verwendet. Dazu wurde es 30 min in DMF quellen gelassen. Es wurde je eine Lösung von 40 mg **102** (20 µmol, 10 Äq.) bzw. 3.3 µL DIPEA (20 µmol, 10 Äq.) in 100 µL DMF hergestellt. Zunächst wurde die Lösung mit DIPEA auf das Harz aufgezogen, dann die Lösung von **102** in DMF zugegeben und für 16 h geschüttelt. Das Harz wurde erneut gewaschen (5x DMF, 10x DCM) und eine kleine Menge Harz für eine Testabspaltung wie oben beschrieben verwendet. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels MALDI-TOF/MS und analytischer HPLC/MS (Gradient 4) untersucht

6.7.2 Versuche zur Konjugation mit dem monodispersen PEG-Succinimidylester **110**

Aufbau der Peptid-PNA-Sequenz mit anschließender PEGylierung am Harz: Es wurden 12.5 mg (2 µmol) des mit Fmoc-Lys(Mmt)-OH beladenen Rink-Amid Harzes **103** eingesetzt. Anschließend wurde die Fmoc-geschützte Sequenz am Harz nach dem in 6.2.3 beschriebenen Protokoll zur automatisierten Festphasensynthese von Peptid-PNA-Konjugaten aufgebaut, das Harz gewaschen (10x DCM) und die Mmt-Schutzgruppe der ε-Aminofunktion des C-terminalen Lysins durch Behandlung mit 1% TFA in DCM mit 5% TIS (2x 2 min) entfernt. Das Harz wurde gewaschen (10x DCM, 5x DMF, 10x DCM) und am Vakuum getrocknet. Eine kleine Menge Harz wurde für eine Testabspaltung in ein Eppendorfgefäß überführt und für 1 h mit 100 µL TFA/TIS/H₂O (18:1:1) schütteln gelassen. Das Konjugat wurde durch Zugabe von 1 mL eiskaltem Ether gefällt und anschließend in 20 µL H₂O mit 1% ACN aufgenommen. Das erhaltene Rohprodukt wurde mittels HPLC/MS analysiert. Das restliche Harz wurde 20 min in DMF quellen gelassen und anschließend 2x 10 min mit 5% DIPEA in DMF schütteln gelassen. Das Harz wurde erneut gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF). Für die PEGylierung wurde das Harz mit 8 µmol (4 Äq.) MS(PEG)₂₄ **110**, 16 µmol (8 Äq.) DIPEA und 3.2 µmol (1.6 Äq.) DMAP in 200 µL DMF für 2 h geschüttelt. Dabei wurden zunächst DIPEA und DMAP in 50 µL DMF auf das Harz gegeben und kurz schütteln gelassen. Anschließend wurde **110** in 150 µL DMF dazugegeben. Nach der Kupplung wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 10x DCM) und eine Testab-

spaltung wie oben beschrieben durchgeführt. Die Analyse des erhaltenen Rohproduktes **109** erfolgte mittels analytischer HPLC (Gradient 5) und MALDI-TOF/MS.

PEGylierung am Harz und anschließender Aufbau der Peptid-PNA-Sequenz: Es wurden 8 μmol (75 mg) des mit Fmoc-Lys(Mmt)-OH beladenen Rinkamid-Harzes **103** eingesetzt. Das Harz wurde für 30 min in DMF quellen gelassen und gewaschen (10x DCM). Anschließend erfolgte die Mmt-Abspaltung in Gegenwart von 1% TFA in DCM mit 5% TIS (2x 2 min) und das Harz wurde erneut gewaschen (10x DCM, 5x DMF). Es wurde 2x für 10 min mit 5% DIPEA in DMF geschüttelt und gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF). Anschließend erfolgte die PEGylierung durch Umsetzung des Harzes mit 36 μmol (4 Äq.) MS(PEG)₂₄ **110** und 72 μmol (8 Äq.) DIPEA in 100 μL DMF für 2 h. Danach wurde das Harz erneut gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF) und ein Kaiser-Test zum Nachweis von freien Aminofunktionen durchgeführt. Dazu wurde eine kleine Menge Harz in einem Eppendorfgefäß mit je drei Tropfen einer Lösung von 80% Phenol in Ethanol, KCN in H₂O/Pyridin und 6% Ninhydrin in Ethanol versetzt und für 5 min bei 100 °C inkubiert. Es folgte der manuelle Aufbau der PNA-Sequenz in **111**: *Fmoc-Abspaltung*: Nach 2 x 1.5 min Schütteln mit je 500 μL DMF/Piperidin (4:1) wurde 5x mit DMF, 5x mit DCM und 5x mit DMF gewaschen. *Kupplung*: Das Harz wurde mit einer Lösung von 10 Äq. des PNA-Monomers, 10 Äq. PyBOP und 20 Äq. NMM in 200 μL trockenem DMF umgesetzt. Nach 30 min Schütteln wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF). *Capping*: Das Harz wurde 5 min in einer Lösung von Pyridin/Ac₂O (9:1) geschüttelt und 5x mit DMF, 5x mit DCM und 5x mit DMF gewaschen. Das erhaltene Harz **112** wurde geteilt und jeweils für die Kupplung der Peptid-Sequenzen in **113** und **114** verwendet: *Fmoc-Abspaltung*: nach 2x 1.5 min Schütteln mit je 500 μL DMF/Piperidin (4:1) wurde 5x mit DMF, 5x mit DCM und 5x mit DMF gewaschen. *Kupplung*: Das Harz wurde mit einer Lösung von 10 Äq. der Fmoc-geschützten Aminosäure bzw. Fmoc-AEEA-OH, 9 Äq. HCTU, 10 Äq. HOBt und 20 Äq. NMM in 200 μL trockenem DMF umgesetzt. Nach 30 min Schütteln wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF). *Capping*: Das Harz wurde 5 min in einer Lösung von Pyridin/Ac₂O (9:1) geschüttelt und 5x mit DMF, 5x mit DCM und 5x mit DMF gewaschen. Die erhaltenen Harze **113** und **114** wurden jeweils erneut geteilt. Je ein Teil wurde für die Synthese von **115** und **116** zunächst 2x 1.5 min mit je 500 μL DMF/Piperidin (4:1) umgesetzt, gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF) und für 30 Minuten mit einer Lösung von 10 Äq. der Fmoc-Ala-OH, 9 Äq. HCTU, 10 Äq. HOBt und 20 Äq. NMM in 200 μL trockenem DMF behandelt. Die Abspaltung der Schutzgruppen und vom Trägerharz sowie die Aufarbeitung erfolgte wie in 6.2.2 beschrieben.

H-Cys-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys-cctacag-Lys(PEG)-NH₂ 92:

Die Synthese von **92** erfolgte entsprechend dem Protokoll für die PEGylierung am Harz mit anschließendem Aufbau der Peptid-PNA-Sequenz.

Ausbeute: OD₂₆₀ = 9.3; 140.0 nmol, 11.7% (bezogen auf den Beladungsgrad des verwendeten Fmoc-Lys(Mmt)-Rinkamid-Harzes **103**; ε₂₆₀ = 66300 L·mol⁻¹·cm⁻¹)

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 3720.9, ber. für [M+H]⁺: 3720.0

UPLC: *t_R*: 1.04 min (Gradient 8)

C₁₅₆H₂₄₉N₅₁O₅₃S (3716.81 g/mol)

H-Cys-Pro-Ile-*aeaa*-cctacag-Lys(PEG)-NH₂ 93:

Die Synthese von **93** erfolgte entsprechend dem Protokoll für die PEGylierung am Harz mit anschließendem Aufbau der Peptid-PNA-Sequenz.

Ausbeute: OD₂₆₀ = 5.2; 78.0 nmol, 6.5% (bezogen auf den Beladungsgrad des verwendeten Fmoc-Lys(Mmt)-Rinkamid-Harzes **103**; ε₂₆₀ = 66300 L·mol⁻¹·cm⁻¹)

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 3535.1, ber. für [M+H]⁺: 3537.8

UPLC: *t_R*: 1.07 min (Gradient 8)

C₁₄₈H₂₃₅N₄₇O₅₂S (3534.69 g/mol)

H-Ala-Cys-Pro-Ile-*aeaa*-cctacag-Lys(PEG)-NH₂ 115:

Die Synthese von **115** erfolgte entsprechend dem Protokoll für die PEGylierung am Harz mit anschließendem Aufbau der Peptid-PNA-Sequenz.

Ausbeute: OD₂₆₀ = 1.9; 29.0 nmol, 2.4% (bezogen auf den Beladungsgrad des verwendeten Fmoc-Lys(Mmt)-Rinkamid-Harzes **103**; ε₂₆₀ = 66300 L·mol⁻¹·cm⁻¹)

MALDI-TOF/MS (*m/z*): gef: 3609.0, ber. für [M+H]⁺: 3608.9

HPLC: *t_R*: 1.07 min (Gradient 8)

$C_{151}H_{240}N_{48}O_{53}S$ (3605.73 g/mol)

H-Ala-Cys-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys-cctacag-Lys(PEG)-NH₂ **116**:

Die Synthese von **116** erfolgte entsprechend dem Protokoll für die PEGylierung am Harz mit anschließendem Aufbau der Peptid-PNA-Sequenz.

Ausbeute: $OD_{260} = 3.4$; 52.0 nmol, 4.3% (bezogen auf den Beladungsgrad des verwendeten Fmoc-Lys(Mmt)-Rinkamid-Harzes **103**; $\epsilon_{260} = 66300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 3791.5, ber. für $[M+H]^+$: 3791.1

UPLC: t_R : 1.04 min (Gradient 8)

$C_{159}H_{254}N_{52}O_{54}S$ (3787.85 g/mol)

6.7.3 Synthese des PEGylierten Thioester-Peptid-PNA-Konjugats **123**

PEG-Gly-ttccccac-Lys(CO(CH₂)₂S-Ala-NH₂)-NH₂ **123**:

Es wurden 5 μmol (30.8 mg) des mit Boc-Lys(Fmoc)-OH beladenen MBHA Harzes **118** eingesetzt. Das Harz wurde für 30 min in DMF quellen gelassen und gewaschen (10x DCM). *Boc-Abspaltung*: Nach 5 min Schütteln mit je 500 μL TFA/*m*-Kresol (19:1) wurde 10x mit DCM und 5x mit DMF gewaschen. *Kupplung*: Das Harz wurde mit einer Lösung von 4 Äq. des PNA-Monomers, 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM in 200 μL trockenem DMF umgesetzt. Nach 30 min Schütteln wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF). Ab der Kupplung des fünften PNA-Monomers wurden Doppelkupplungen durchgeführt. *Capping*: Das Harz wurde 5 min in einer Lösung von Pyridin/ Ac_2O (9:1) geschüttelt und 5x mit DMF und 10x mit DCM gewaschen. Anschließend erfolgte die zweimalige Kupplung von Boc-Gly-OH durch Behandlung des Harzes mit 4 Äq. der Aminosäure, 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM in 200 μL DMF. Es wurde gewaschen (5x DMF, 10x DCM), die Boc-Schutzgruppe wie oben beschrieben abgespalten und erneut gewaschen (10x DCM, 5x DMF). Dann erfolgte die Kupplung von PEG durch Umsetzung des Harzes mit 20 μmol (4 Äq.) MS(PEG)_{24} **110** und 40 μmol (8 Äq.) DIPEA in 100 μL DMF für 2 h. Danach wurde das Harz erneut gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF). Anschließend erfolgte der Aufbau der Thioestereinheit am C-Terminus. Die Fmoc-Schutzgruppe

Experimenteller Teil

der Lysinseitenkette wurde durch Behandlung mit 2x 500 μ L DMF/Piperidin (4:1) abgespalten und das Harz gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF). Anschließend wurde das Harz mit 4 Äq. Trityl-geschützter Mercaptopropionsäure (MPS) mit 4 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM umgesetzt. Nach 45 min wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF) und die Kupplung wiederholt. Danach wurde das Harz mit 5x DMF und 10x DCM gewaschen. Nach Abspaltung der Trityl-Schutzgruppe durch 30-minütige Behandlung mit TFA/TIS (95:5) und Waschen des Harzes (10x DCM, 5x DMF) wurde Boc-Ala-OH gekuppelt. Dazu wurde das Harz 2x 45 min mit 10 Äq. Boc-Ala-OH umgesetzt, welches mit 10 Äq. PyBOP und 8 Äq. NMM voraktiviert wurde. Anschließend wurde das Harz gewaschen (5x DMF, 5x DCM, 5x DMF) und für 5 min mit Pyridin/ Ac_2O (9:1) behandelt und erneut gewaschen (5x DMF, 10x DCM). Die Abspaltung der Schutzgruppen und vom Trägerharz sowie die Aufarbeitung erfolgte wie in 6.2.2 beschrieben.

Ausbeute: $\text{OD}_{260} = 22.9$; 350.0 nmol, 7.0% (bezogen auf den Beladungsgrad des verwendeten Boc-Lys(Fmoc)-MBHA-Harzes **118**; $\epsilon_{260} = 65500 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)

MALDI-TOF/MS (m/z): gef: 3496.2, ber. für $[\text{M}+\text{H}]^+$: 3497.69

UPLC: t_R : 1.04 min (Gradient 8)

$\text{C}_{145}\text{H}_{227}\text{N}_{45}\text{O}_{54}\text{S}$ (3494.61 g/mol)

7 Literaturverzeichnis

- [1] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
- [2] S. K. Silverman, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 7180-201.
- [3] X. Li, D. R. Liu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 4848-70.
- [4] K. V. Gothelf, R. S. Brown, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1062-9.
- [5] Z. J. Gartner, B. N. Tse, R. Grubina, J. B. Doyon, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Science* **2004**, *305*, 1601-5.
- [6] M. Clark, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 396-403.
- [7] J. Scheuermann, C. E. Dumelin, S. Melkko, D. Neri, *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 568-81.
- [8] J. Scheuermann, D. Neri, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 931-7.
- [9] R. K. Bruick, P. E. Dawson, S. B. H. Kent, N. Usman, G. F. Joyce, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 49-56.
- [10] K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 799-803.
- [11] J. C. Pieck, D. Kuch, F. Grolle, U. Linne, C. Haas, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1404-5.
- [12] F. Diezmann, O. Seitz, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5789-801.
- [13] H. Eberhard, F. Diezmann, O. Seitz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 4146-50.
- [14] T. N. Grossmann, O. Seitz, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 6723-30.
- [15] Z. Pianowski, K. Gorska, L. Oswald, C. a Merten, N. Winssinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6492-7.
- [16] A. P. Silverman, E. T. Kool, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3775-3789.
- [17] H. Abe, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 263-8.
- [18] S. Ficht, A. Mattes, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9970-81.
- [19] M. F. Jacobsen, E. Cló, A. Mokhir, K. V. Gothelf, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 793-9.
- [20] K. Rinaudo, L. Bleris, R. Maddamsetti, S. Subramanian, R. Weiss, Y. Benenson, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 795-801.
- [21] N. C. Seeman, *Nature* **2003**, *421*, 427-31.
- [22] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1856-76.

- [23] M. Endo, H. Sugiyama, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2420-43.
- [24] Z. L. Pianowski, N. Winssinger, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1330-6.
- [25] L. Röglin, O. Seitz, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3881-7.
- [26] C. M. Niemeyer, *Nano Today* **2007**, *2*, 42–52.
- [27] J. Berger, M. Oberhuber, *Chem. Biodiversity* **2010**, *7*, 2581-615.
- [28] M. W. Kanan, M. M. Rozenman, K. Sakurai, T. M. Snyder, D. R. Liu, *Nature* **2004**, *431*, 545-9.
- [29] Y. Chen, A. S. Kamlet, J. B. Steinman, D. R. Liu, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 146-53.
- [30] D. J. Gorin, A. S. Kamlet, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9189-91.
- [31] M. M. Rozenman, M. W. Kanan, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14933-8.
- [32] Z. J. Gartner, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6961-3.
- [33] Z. Ma, J. S. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 11159-63.
- [34] B. C. Nwanguma, *J. Biotechnol.* **2003**, *2*, 649-656.
- [35] J. H. Thrall, *Radiology* **2004**, *231*, 613-6.
- [36] Y. Benenson, B. Gil, U. B. Dor, R. Adar, E. Shapiro, *Nature* **2004**, *429*, 423–429.
- [37] B. Gil, M. K. Hanum, N. Skirtenko, R. Adar, E. Shapiro, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 2989-96.
- [38] H. Masu, A. Narita, T. Tokunaga, M. Ohashi, Y. Aoyama, S. Sando, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 9481-3.
- [39] C. I. An, V. B. Trinh, Y. Yokobayashi, *RNA* **2006**, *12*, 710-6.
- [40] C. Portela, F. Albericio, R. Eritja, L. Castedo, J. L. Mascareñas, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1110-4.
- [41] L. Röglin, F. Altenbrunn, O. Seitz, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 758-65.
- [42] L. Röglin, M. R. Ahmadian, O. Seitz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 2704-7.
- [43] R. Mahato, W. Tai, K. Cheng, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, *63*, 659-670.
- [44] F. Kratz, I. Müller, C. Ryppa, A. Warnecke, *ChemMedChem* **2008**, *3*, 20-53.
- [45] C. Andrady, S. K. Sharma, K. A. Chester, *Immunotherapy* **2011**, *3*, 193-211.
- [46] W. A. Denny, *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 577–595.
- [47] S. K. Taylor, R. Pei, B. C. Moon, S. Damera, A. Shen, M. N. Stojanovic, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4394-7.

- [48] F. Nagatsugi, S. Nakayama, S. Sasaki, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, 26, 799-803.
- [49] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 303-8.
- [50] S. Tyagi, D. P. Bratu, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1998**, 16, 49-53.
- [51] E. Cló, J. W. Snyder, N. V. Voigt, P. R. Ogilby, K. V. Gothelf, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4200-1.
- [52] D. Arian, E. Cló, K. V. Gothelf, A. Mokhir, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 288-95.
- [53] D. Arian, L. Kovbasyuk, A. Mokhir, *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 12010-7.
- [54] J. Chen, J. F. Lovell, P. C. Lo, K. Stefflova, M. Niedre, B. C. Wilson, G. Zheng, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 775-81.
- [55] Y. Gao, G. Qiao, L. Zhuo, N. Li, Y. Liu, B. Tang, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 5316-8.
- [56] Z. Ma, J. S. Taylor, *Bioconjugate Chem.* **2003**, 14, 679-83.
- [57] J. Cai, X. Li, J. S. Taylor, *Org. Lett.* **2005**, 7, 751-4.
- [58] J. Brunner, A. Mokhir, R. Krämer, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12410-1.
- [59] I. Boll, R. Krämer, J. Brunner, A. Mokhir, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7849-56.
- [60] F. H. Zelder, J. Brunner, R. Krämer, *Chem. Commun.* **2004**, 902-3.
- [61] S. Sando, H. Abe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1081-7.
- [62] S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9686-7.
- [63] A. P. Silverman, E. J. Baron, E. T. Kool, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1890-4.
- [64] S. Sando, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2096-7.
- [65] H. Abe, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13980-6.
- [66] R. M. Franzini, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 16021-3.
- [67] K. Gorska, A. Manicardi, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Commun.* **2011**, 4364-4367.
- [68] T. N. Grossmann, L. Röglin, O. Seitz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 7119-22.
- [69] T. N. Grossmann, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15596-7.
- [70] T. N. Grossmann, A. Strohbach, O. Seitz, *ChemBioChem* **2008**, 9, 2185-92.
- [71] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, 266, 776-779.
- [72] T. M. Snyder, D. R. Liu, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, 44, 7379-82.

- [73] M. L. McKee, A. C. Evans, S. R. Gerrard, R. K. O'Reilly, A. J. Turberfield, E. Stulz, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1661-6.
- [74] A. Erben, DNA-katalysierte Peptidfragmentübertragungen: Ein Ansatz Zur DNA-gesteuerten Synthese von Peptid-PNA-Konjugaten, Humboldt-Universität zu Berlin, **2007**.
- [75] A. Erben, T. N. Grossmann, O. Seitz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 4993-7.
- [76] A. Erben, T. N. Grossmann, O. Seitz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 2828-32.
- [77] C. Borghouts, C. Kunz, B. Groner, *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 713-26.
- [78] R. Florian, P. Gruber, J. Hofmann, J. Kirchmair, *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 1305-1319.
- [79] P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-500.
- [80] M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Norden, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566-8.
- [81] H. Yin, Q. Lu, M. Wood, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 38-45.
- [82] P. E. Nielsen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 71-5.
- [83] A. Ray, B. Nordén, *FASEB J.* **2000**, *14*, 1041-60.
- [84] U. Koppelhus, P. E. Nielsen, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 267-80.
- [85] K. E. Lundin, L. Good, R. Strömberg, A. Gräslund, C. I. E. Smith, *Adv. Gen.* **2006**, *56*, 1-51.
- [86] S. E. Hamilton, C. G. Simmons, I. S. Kathiriya, D. R. Corey, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 343-51.
- [87] P. E. Nielsen, *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 3118-23.
- [88] S. Shakeel, S. Karim, A. Ali, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 892-899.
- [89] B. Hyrup, P. E. Nielsen, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 5-23.
- [90] C. Dose, O. Seitz, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4365-8.
- [91] T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, *J. Pept. Res.* **1997**, *49*, 80-8.
- [92] S. Thomson, J. Josey, R. Cadilla, M. Gaul, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 6179-6194.
- [93] S. Thurley, L. Röglin, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12693-5.
- [94] C. Dose, S. Ficht, O. Seitz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5369-73.
- [95] S. Kummer, A. Knoll, E. Socher, L. Bethge, A. Herrmann, O. Seitz, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 1931-4.

- [96] C. A. Schmitt, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 286-95.
- [97] T. K. Oost, C. Sun, R. C. Armstrong, A.-S. Al-Assaad, S. F. Betz, T. L. Deckwerth, H. Ding, S. W. Elmore, R. P. Meadows, E. T. Olejniczak, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 4417-26.
- [98] S. W. Lowe, A. W. Lin, *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 485-95.
- [99] S. Wang, *Curr. Top. Microbiol. Immun.* **2011**, *348*, 89-113.
- [100] D. W. Nicholson, *Nature* **2000**, *407*, 810-6.
- [101] C. Du, M. Fang, Y. Li, L. Li, X. Wang, *Cell* **2000**, *102*, 33-42.
- [102] A. M. Verhagen, P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson, D. L. Vaux, *Cell* **2000**, *102*, 43-53.
- [103] C. R. Arnt, M. V. Chiorean, M. P. Heldebrant, G. J. Gores, S. H. Kaufmann, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44236-43.
- [104] S. Fulda, W. Wick, M. Weller, K. M. Debatin, *Nat. Med.* **2002**, *8*, 808-15.
- [105] L. Yang, T. Mashima, S. Sato, M. Mochizuki, H. Sakamoto, T. Yamori, T. Ohara, T. Tsuruo, *Cancer research* **2003**, *63*, 831.
- [106] R. Kipp, M. Case, A. D. Wist, C. M. Cresson, M. Carrell, E. Griner, A. Wiita, P. Albinia, J. Chai, Y. Shi, *Biochemistry* **2002**, *41*, 7344-9.
- [107] J. Chen, Z. Nikolovska-Coleska, G. Wang, S. Qiu, S. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5805-8.
- [108] Z. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P. P. Roller, K. Krajewski, N. G. Saito, J. Stuckey, *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 261-73.
- [109] S. K. Sharma, C. Straub, L. Zawel, *Int. J. Pep. Res. Ther.* **2006**, *12*, 21-32.
- [110] K. Zobel, L. Wang, E. Varfolomeev, M. C. Franklin, L. O. Elliott, H. J. A. Wallweber, D. C. Okawa, J. A. Flygare, D. Vucic, W. J. Fairbrother, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 525-33.
- [111] Q. Cai, H. Sun, Y. Peng, J. Lu, Z. Nikolovska-Coleska, D. McEachern, L. Liu, S. Qiu, C. Y. Yang, R. Miller, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 2714-26.
- [112] D. L. Vaux, S. J. Korsmeyer, *Cell* **1999**, *96*, 245-254.
- [113] J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, A. R. Currie, *Br. J. Cancer* **1972**, *26*, 239-257.
- [114] P. Meier, A. Finch, G. Evan, *Nature* **2000**, *407*, 796-801.
- [115] C. S. Straub, *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 291-316.
- [116] F. Höffeler, *BIUZ* **2004**, *34*, 16-23.

- [117] I. Tamm, S. M. Kornblau, H. Segall, S. Krajewski, K. Welsh, S. Kitada, D. A. Scudiero, G. Tudor, Y. H. Qui, A. Monks, *Clinical Cancer Res.* **2000**, *6*, 1796-803.
- [118] Q. L. Deveraux, J. C. Reed, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 239-252.
- [119] M. Holcik, H. Gibson, R. G. Korneluk, *Apoptosis* **2001**, *6*, 253-61.
- [120] J. Li, Q. Feng, J. M. Kim, D. Schneiderman, P. Liston, M. Li, B. Vanderhyden, W. Faught, M. F. Fung, M. Senterman, *Endocrinology* **2001**, *142*, 370-80.
- [121] J. M. Cummins, M. Kohli, C. Rago, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, F. Bunz, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3006-3008.
- [122] E. N. Shiozaki, Y. Shi, *Trends Biochem. Sci* **2004**, *29*, 486-94.
- [123] E. N. Shiozaki, J. Chai, D. J. Rigotti, S. J. Riedl, P. Li, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, R. Fairman, Y. Shi, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 519-27.
- [124] S. M. Srinivasula, R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R. a Lee, P. D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi, *Nature* **2001**, *410*, 112-6.
- [125] J. Chai, E. Shiozaki, S. M. Srinivasula, Q. Wu, P. Datta, E. S. Alnemri, Y. Shi, P. Dataa, *Cell* **2001**, *104*, 769-80.
- [126] Y. Huang, Y. C. Park, R. L. Rich, D. Segal, D. G. Myszka, H. Wu, *Cell* **2001**, *104*, 781-90.
- [127] S. J. Riedl, M. Renatus, R. Schwarzenbacher, Q. Zhou, C. Sun, S. W. Fesik, R. C. Liddington, G. S. Salvesen, *Cell* **2001**, *104*, 791-800.
- [128] J. Chai, C. Du, J. W. Wu, S. Kyin, X. Wang, Y. Shi, *Nature* **2000**, *406*, 855-62.
- [129] Z. Liu, C. Sun, E. T. Olejniczak, R. P. Meadows, S. F. Betz, T. Oost, J. Herrmann, J. C. Wu, S. W. Fesik, *Nature* **2000**, *408*, 1004-8.
- [130] C. J. Glover, K. Hite, R. DeLosh, D. A. Scudiero, M. J. Fivash, L. R. Smith, R. J. Fisher, J. W. Wu, Y. Shi, R. A. Kipp, *Anal. Biochem.* **2003**, *320*, 157-169.
- [131] H. Sun, Z. Nikolovska-Coleska, J. Chen, C. Y. Yang, Y. Tomita, H. Pan, Y. Yoshioka, K. Krajewski, P. P. Roller, S. Wang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 793-7.
- [132] M. C. Sweeney, X. Wang, J. Park, Y. Liu, D. Pei, *Biochemistry* **2006**, *45*, 14740-8.
- [133] Z. Nikolovska-Coleska, J. L. Meagher, S. Jiang, C. Yang, S. Qiu, P. P. Roller, J. A. Stuckey, S. Wang, *Biochemistry* **2008**, *47*, 9811-24.
- [134] H. Sun, Z. Nikolovska-Coleska, J. Lu, J. L. Meagher, C. Y. Yang, S. Qiu, Y. Tomita, Y. Ueda, S. Jiang, K. Krajewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15279-94.
- [135] H. Sun, Z. Nikolovska-Coleska, J. Lu, S. Qiu, C. Y. Yang, W. Gao, J. Meagher, J. Stuckey, S. Wang, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7916-20.
- [136] A. Maruyama, M. Katoh, T. Ishihara, T. Akaike, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 3-6.

- [137] K. J. Hampel, P. Crosson, J. S. Lee, *Biochemistry* **1991**, *30*, 4455-9.
- [138] J. J. Nestor, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 4399-418.
- [139] F. M. Veronese, A. Mero, *BioDrugs* **2008**, *22*, 315-329.
- [140] I. R. Ruttekolk, F. Duchardt, R. Fischer, K. H. Wiesmüller, J. Rademann, R. Brock, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2081-7.
- [141] G. Wu, J. Chai, T. L. Suber, J. W. Wu, C. Du, X. Wang, Y. Shi, *Nature* **2000**, *408*, 1008-12.
- [142] I. R. Ruttekolk, A. Chakrabarti, M. Richter, F. Duchardt, H. Glauner, W. P. R. Verdurmen, J. Rademann, R. Brock, *Mol. Pharmacol.* **2011**, *79*, 692-700.
- [143] J. Hossbach, E. Michalsky, P. Henklein, M. Jäger, P. T. Daniel, R. Preissner, *Peptides* **2009**, *30*, 2374-9.
- [144] C. Sun, M. Cai, R. P. Meadows, N. Xu, A. H. Gunasekera, J. Herrmann, J. C. Wu, S. W. Fesik, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 33777-81.
- [145] H. G. Häcker, M. T. Sisay, M. Gütschow, *Pharmacol. Ther.* **2011**, *132*, 180-195.
- [146] H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, *Methods* **1999**, *17*, 313-9.
- [147] K. M. Boatright, M. Renatus, F. L. Scott, S. Sperandio, H. Shin, I. M. Pedersen, J. Ricci, W. A. Edris, D. P. Sutherlin, D. R. Green, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 529-541.
- [148] S. J. Riedl, G. S. Salvesen, *Nat. Rev.* **2007**, *8*, 405-13.
- [149] C. Pop, G. S. Salvesen, F. L. Scott, *Methods Enzymol.* **2008**, *446*, 351-67.
- [150] H. R. Stennicke, Q. L. Deveraux, E. W. Humke, J. C. Reed, V. M. Dixit, G. S. Salvesen, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 8359-8362.
- [151] C. Pop, P. Fitzgerald, D. R. Green, G. S. Salvesen, *Biochemistry* **2007**, *46*, 4398-4407.
- [152] H. R. Stennicke, J. M. Jürgenmeister, H. Shin, Q. Deveraux, B. B. Wolf, X. Yang, Q. Zhou, H. M. Ellerby, L. M. Ellerby, D. Bredesen, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27084 - 27090.
- [153] S. P. Cullen, A. U. Lüthi, S. J. Martin, *Methods* **2008**, *44*, 273-9.
- [154] H. M. Ellerby, S. J. Martin, L. M. Ellerby, S. S. Naiem, S. Rabizadeh, G. S. Salvesen, C. A. Casiano, N. R. Cashman, D. R. Green, D. E. Bredesen, *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 6165-6178.
- [155] H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 25719-25723.
- [156] S. M. Srinivasula, P. Datta, X. J. Fan, T. Fernandes-Alnemri, Z. Huang, E. S. Alnemri, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 36152-7.
- [157] N. Bendifallah, F. W. Rasmussen, V. Zachar, P. Ebbesen, P. E. Nielsen, U. Koppelhus, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 750-8.

- [158] T. Shiraishi, R. Hamzavi, P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 4424-32.
- [159] B. Lebleu, H. M. Moulton, R. Abes, G. D. Ivanova, S. Abes, D. A. Stein, P. L. Iversen, A. A. Arzumanov, M. J. Gait, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 517-29.
- [160] E. Socher, Erzwungene Interkalation in Einfach- und doppelt-markierten FIT-PNA-Sonden: Hochempfindliche Sequenzspezifische DNA- und RNA-Detektion in Echtzeit, Humboldt-Universität zu Berlin, **2010**.
- [161] G. M. Bonora, S. Drioli, M. Ballico, A. Faccini, R. Corradini, S. Cogoi, L. Xodo, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, *26*, 661-4.
- [162] P. Bailon, C. Y. Won, *Expert Opin. Drug Del.* **2009**, *6*, 1-16.
- [163] R. B. Greenwald, Y. H. Choe, J. McGuire, C. D. Conover, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2003**, *55*, 217-50.
- [164] F. M. Veronese, *Biomaterials* **2001**, *22*, 405-17.
- [165] J. M. Harris, R. B. Chess, *Nat. Rev.* **2003**, *2*, 214-21.
- [166] M. Morpurgo, C. Monfardini, L. J. Hofland, M. Sergi, P. Orsolini, J. M. Dumont, F. M. Veronese, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 1238-43.
- [167] E. Kaiser, R. Colescott, C. Bossinger, P. Cook, *Anal. Biochemistry* **1970**, *34*, 595-598.
- [168] L. A. Canalle, D. W. P. M. Löwik, J. C. M. van Hest, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 329-53.
- [169] A. M. Felix, Y. A. Lu, R. M. Campbell, *Int. J. Pep. Prot. Res.* **2000**, *46*, 253-64.
- [170] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. F. Hugh, *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- [171] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, et al., *Science* **2001**, *291*, 1304-51.
- [172] C. Greenman, P. Stephens, R. Smith, G. L. Dalgliesh, C. Hunter, G. Bignell, H. Davies, J. Teague, A. Butler, C. Stevens, et al., *Nature* **2007**, *446*, 153-8.
- [173] M. R. Stratton, P. J. Campbell, P. A. Futreal, *Nature* **2009**, *458*, 719-24.
- [174] J. A. Zorn, J. A. Wells, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 179-188.
- [175] T. Nguyen, E. M. Menocal, J. Harborth, J. H. Fruehauf, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2008**, *10*, 158-167.
- [176] P. J. Santangelo, B. Nix, A. Tsourkas, G. Bao, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, e57.
- [177] L. M. Miller Jenkins, D. E. Ott, R. Hayashi, L. V. Coren, D. Wang, Q. Xu, M. L. Schito, J. K. Inman, D. H. Appella, E. Appella, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 887-9.
- [178] T. M. Hackeng, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 10068-10073.

- [179] K. K. Pasunooti, R. Yang, S. Vedachalam, B. K. Gorityala, C. F. Liu, X.-W. Liu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6268-71.
- [180] Z. Harpaz, P. Siman, K. S. A. Kumar, A. Brik, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1232-5.
- [181] Applied Biosystems/Ambion, "Oligonucleotide MW and Extinction Coefficient Calculator," http://www.ambion.com/techlib/misc/oligo_calculator.html,
- [182] Invitrogen, *Fluorescence Polarization - Technical Resource Guide*, Invitrogen, **2006**.
- [183] H. Du, R. C. A. Fuh, J. Li, L. A. Corkan, J. S. Lindsey, *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 141-142.

8 Anhang

8.1 HPLC-Chromatogramme und Reaktionskinetik zur Reaktion von 58a und 59a

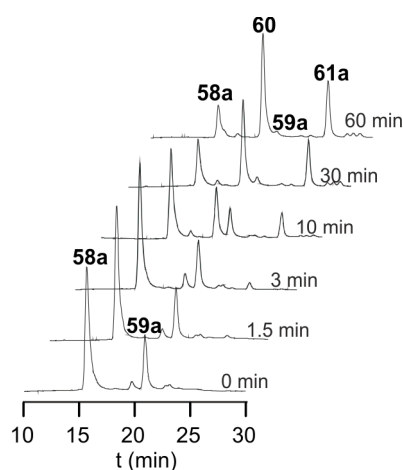


Abbildung 67: HPLC-Chromatogramme der Reaktion von **58a** und **59a** in Anwesenheit von komplementärer DNA **Ma**. Bedingungen: c_{58a} : 1 μ M; c_{59a} : 2 μ M in 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, 0.1 mM Spermin, 0.1 mg/mL BSA, 10 mM MgCl_2 , 0.2 mM TCEP, pH 7.5.

Tabelle 11: Reaktionskinetik für die Transferreaktion des Thioesters **58a** mit dem Thiol **59a**. Angegeben ist die Ausbeute an **61a**. Bedingungen: siehe Abbildung 67. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus zwei Messungen.

t (min)	Ausbeute (%)	Ausbeute (nM)
0	0	0.00
3	13	130
5	25	250
8	35	350
10	45	450
15	60	600
30	80	800
50	90	900
90	93	930

8.2 Vorexperiment zur Bestimmung der IC_{50} -Werte mittels Fluoreszenzanisotropie

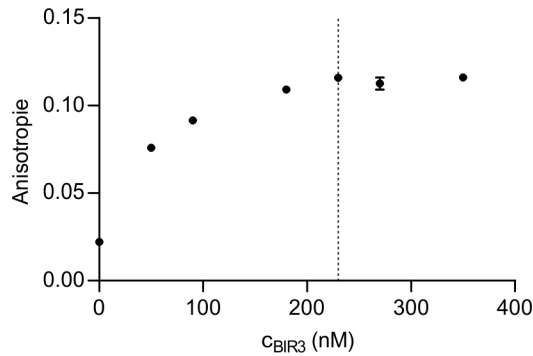


Abbildung 68: Fluoreszenzanisotropie des Referenzpeptids **65** in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen BIR3. Bedingungen: 5 nM **65** in 100 mM NaH_2PO_4 (pH 7.5), 10 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 0.2 mM TCEP, 0.1 mM Spermin, 0.1 mg/mL BSA wurden mit verschiedenen Konzentrationen BIR3 versetzt.

8.3 Stabilität von **76a** in Zelllysat

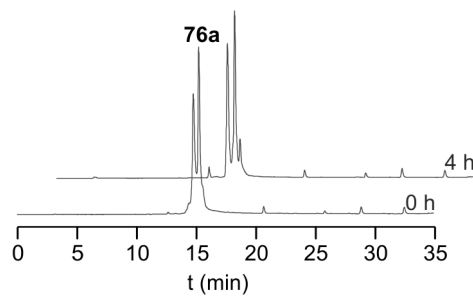


Abbildung 69: HPLC-Chromatogramme ($\lambda_{ex} = 485$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm) von **76a** nach einer Inkubation in HeLa-Zelllysat von 0 h und 4 h. Gradient 6.

8.4 IC_{50} -Bestimmung für die Inhibition von Caspase-9 und Caspase-3 durch BIR3

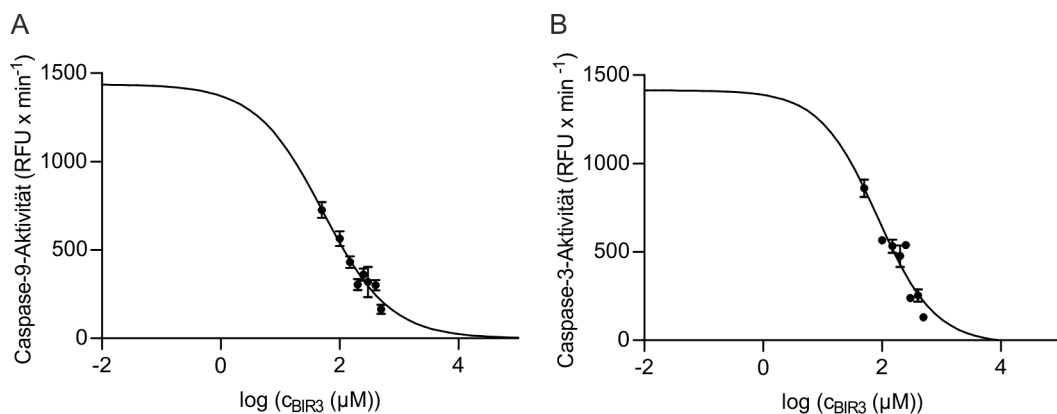
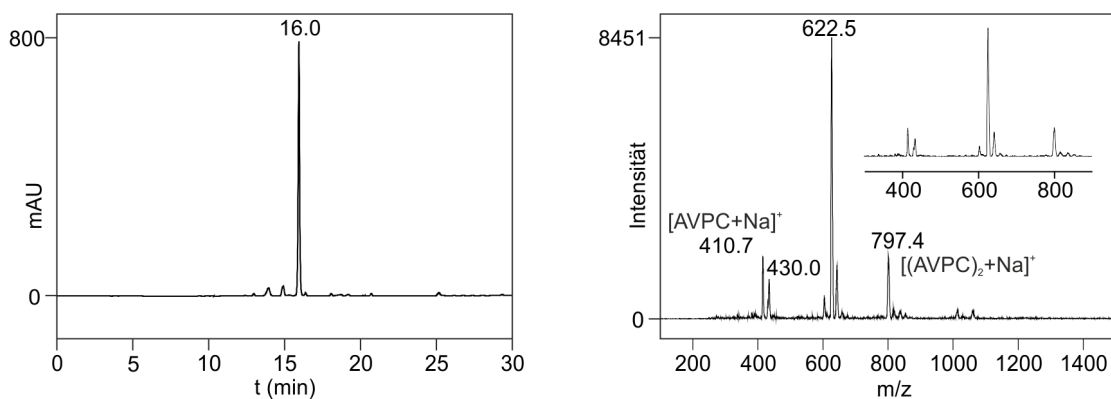


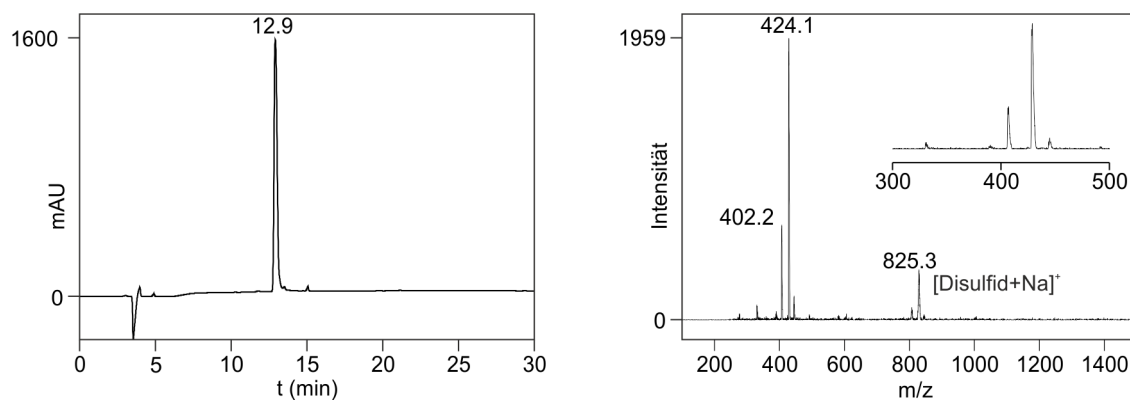
Abbildung 70: Nichtlineare Regression zur Ermittlung der Inhibitionskonstanten IC_{50} für die Inhibition der A) Caspase-9 und B) Caspase-3 durch BIR3.

8.5 Analytik der synthetisierten Peptide und Peptid-PNA-Konjugate

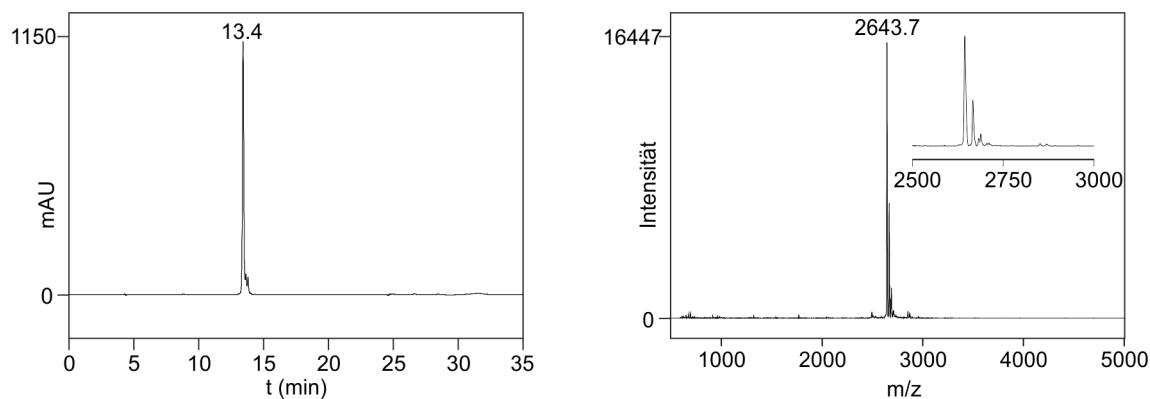
H-Ala-Val-Pro-Cys(Badan)-NH₂ **62**:



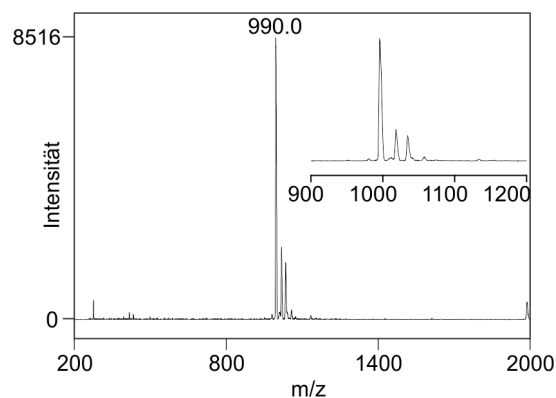
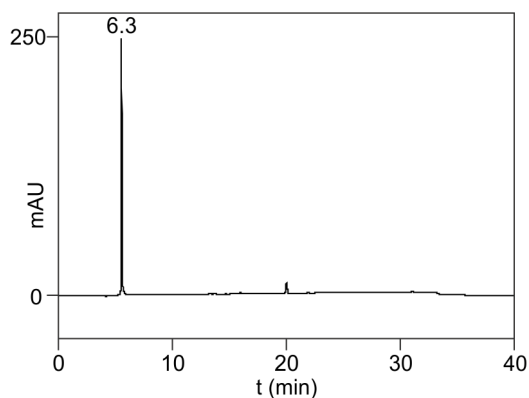
H-Ala-Cys-Pro-Ile-NH₂ **63**:



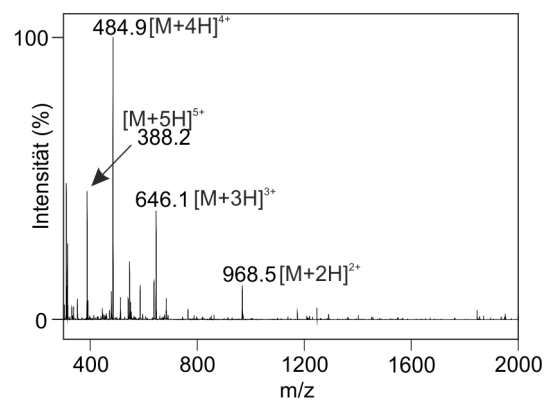
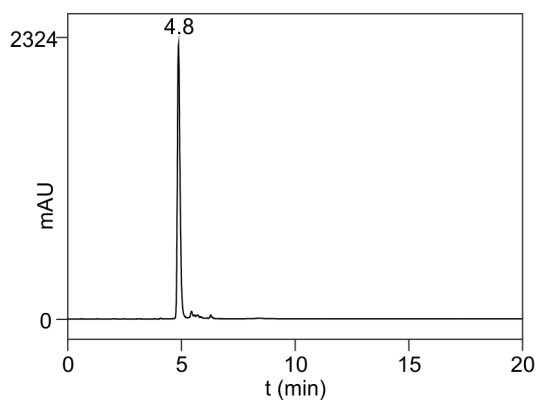
H-Ala-Val-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys-cctacag-Gly-NH₂ **64**:



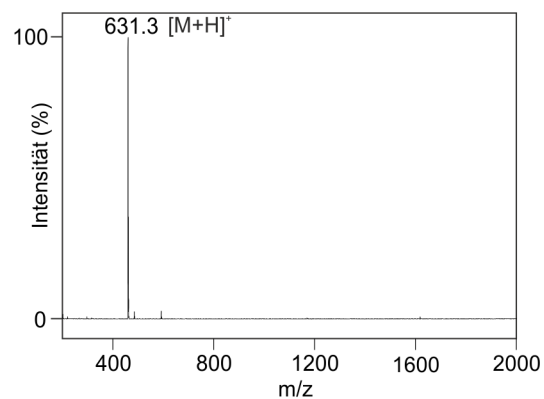
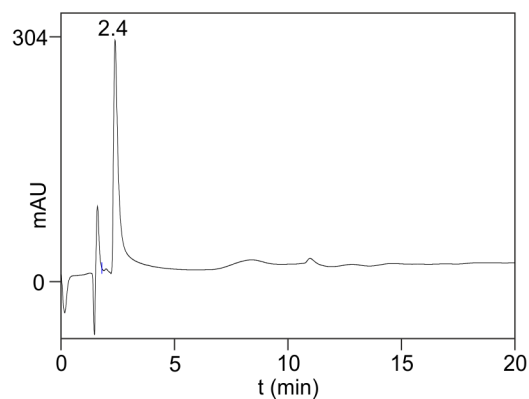
H-Abu-Arg-Pro-Phe-Lys(FAM)-NH₂ **65**:



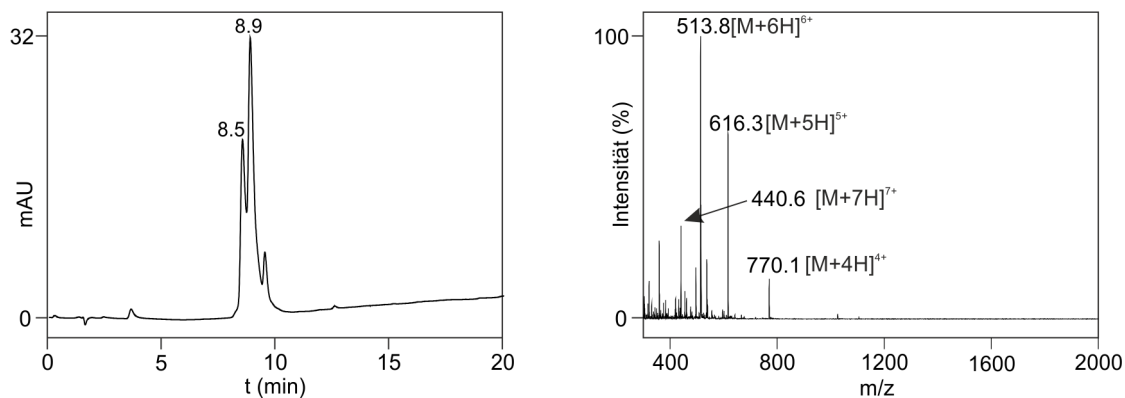
H-cctacag-Gly-NH₂ **66**:



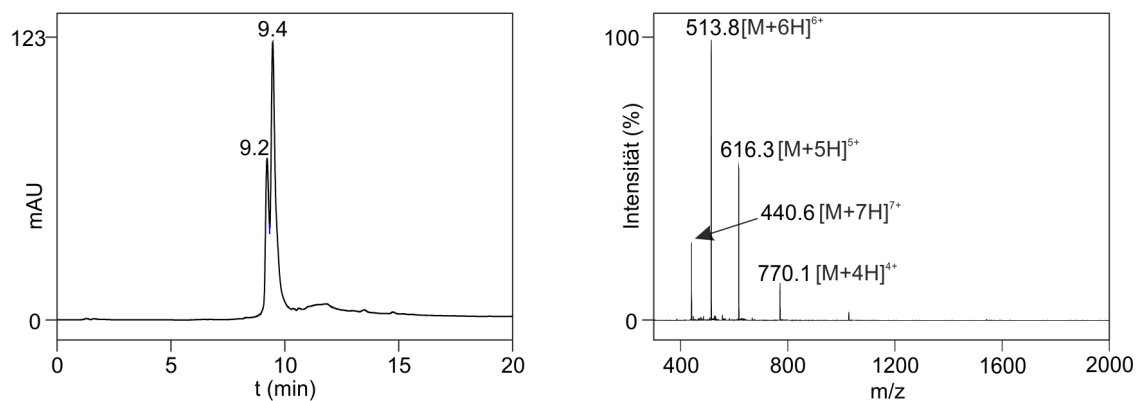
H-Abu-Arg-Pro-Phe-Lys-NH₂ **71**:



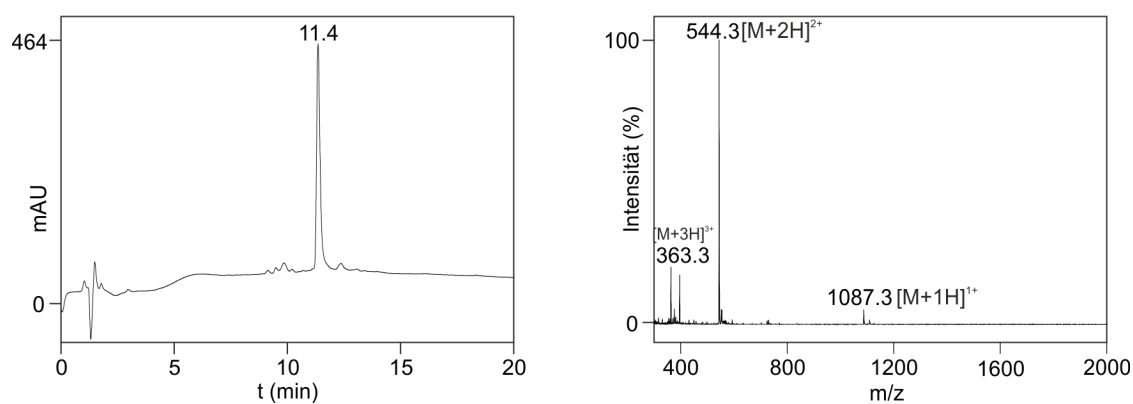
H-Ala-Cys-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys-cctacag-Lys(FAM)-NH₂ **76a**:



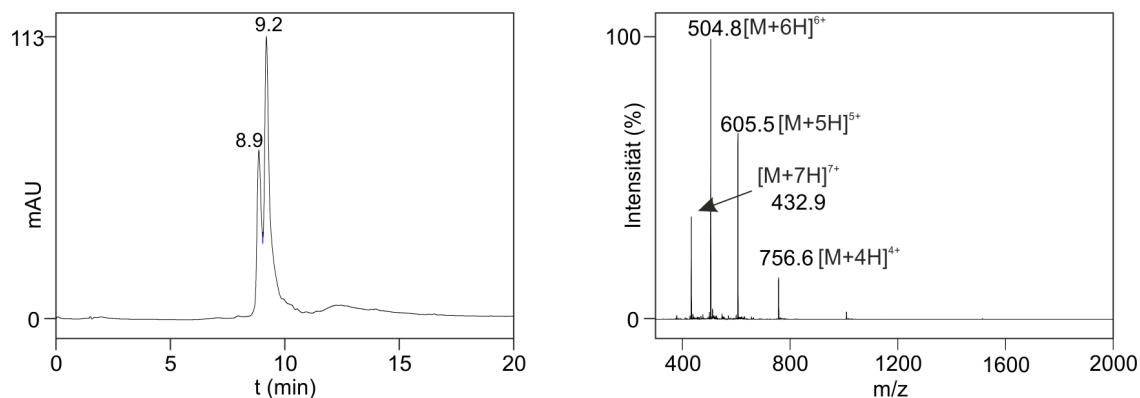
H-Ala-Cys-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys(FAM)-cctacag-Lys-NH₂ **76b**:



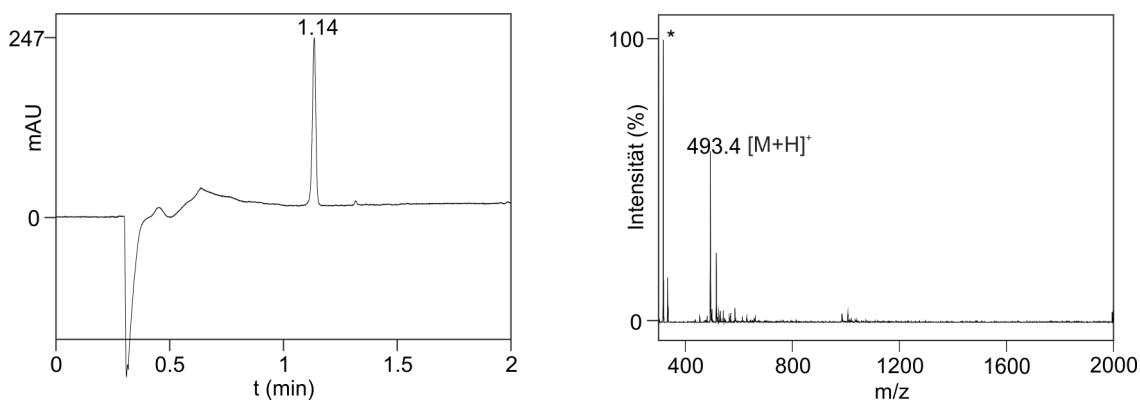
H-Ala-Cys-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys(FAM)-NH₂ **80**:



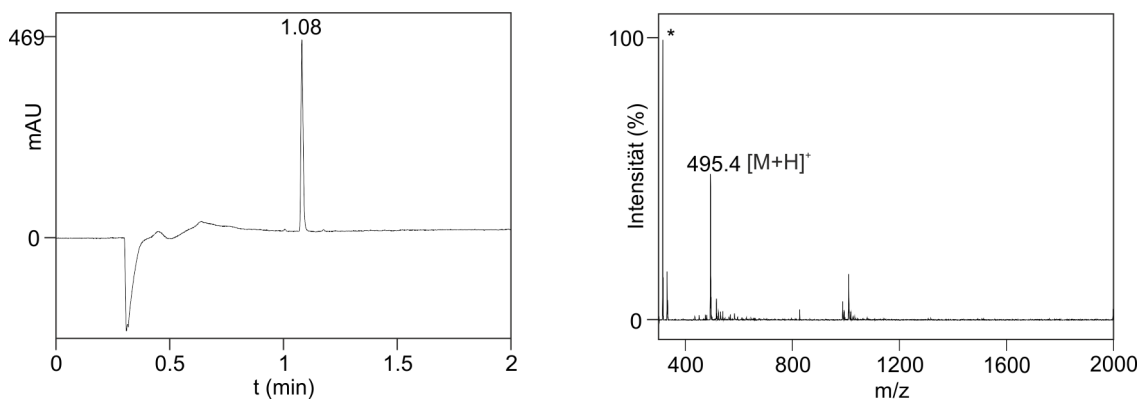
H-Ala-Cys-Pro-Ile-*aeaa*-Lys-cctacag-Lys(FAM)-NH₂ **81**:



H-D-Ala-D-Cys-L-Pro-D-Phe-L-Gly-NH₂ **84**:

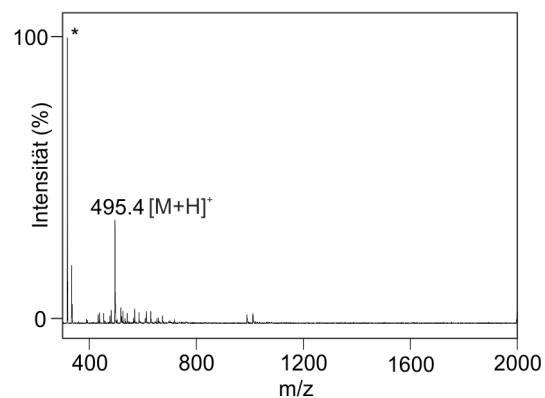
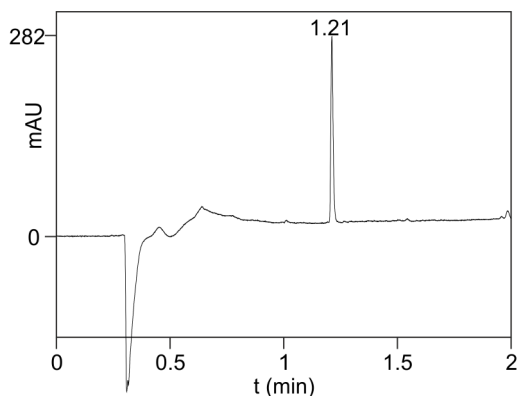


H-D-Phe-L-Cys-L-Val-L-Ala-L-Gly-NH₂ **85**:

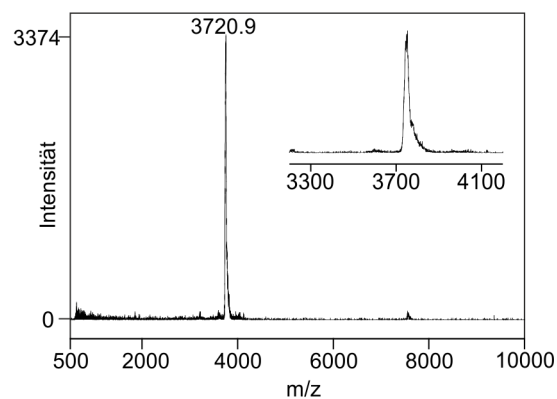
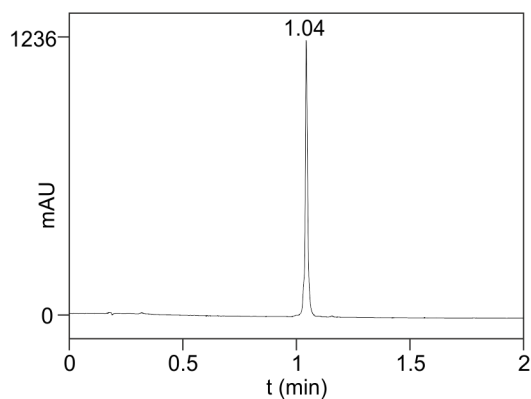


* m/z 314 tritt als Artefakt im MS-Spektrum auf.

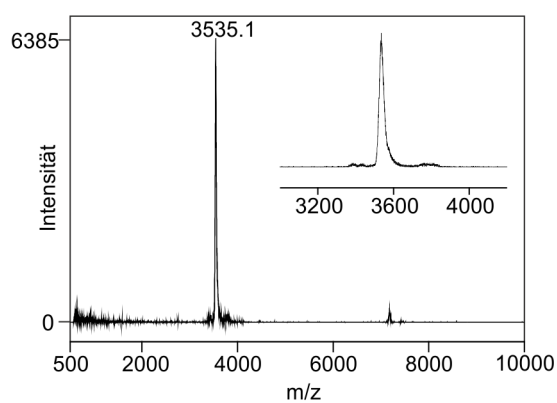
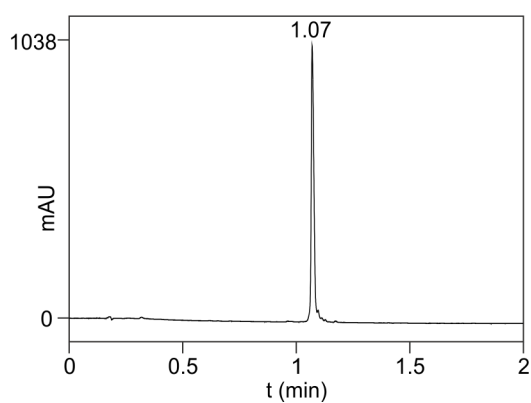
H-D-Phe-L-Cys-D-Val-D-Ala-L-Gly-NH₂ **86**:



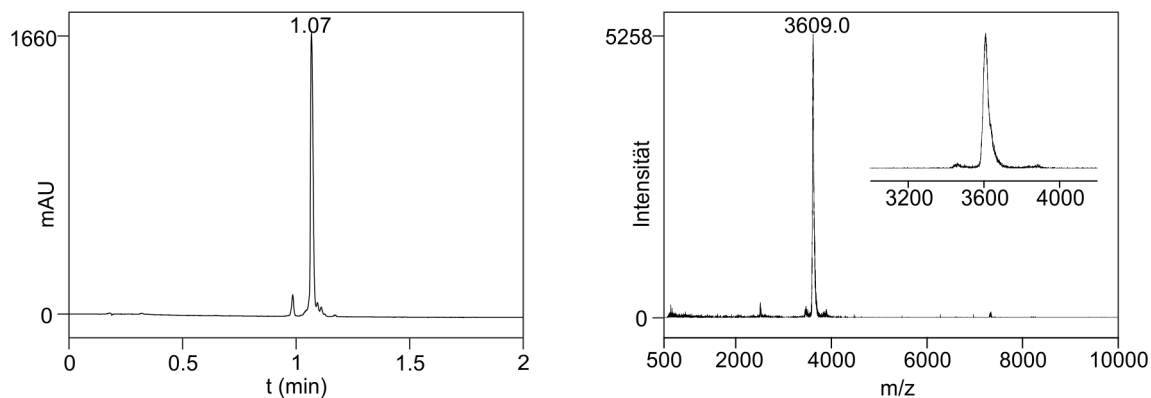
H-Cys-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys-cctacag-Lys(PEG)-NH₂ **92**:



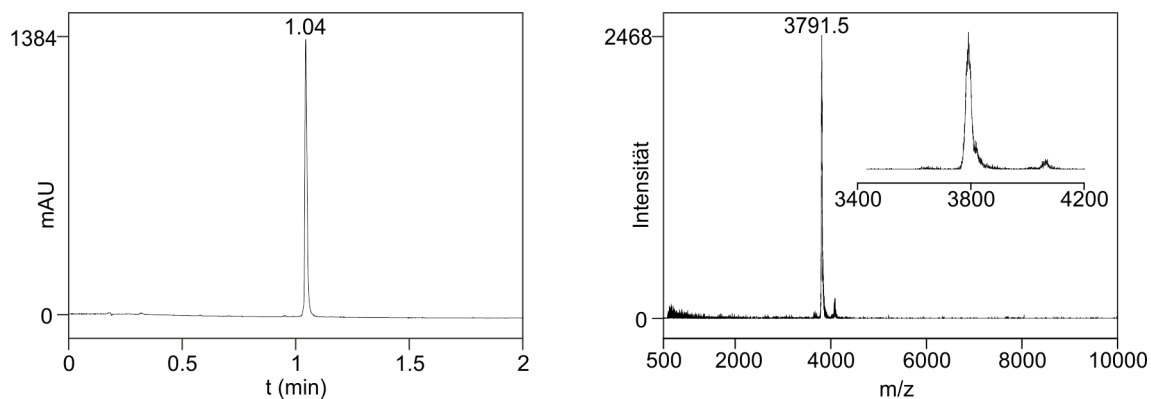
H-Cys-Pro-Ile-*aeaa*-cctacag-Lys(PEG)-NH₂ **93**:



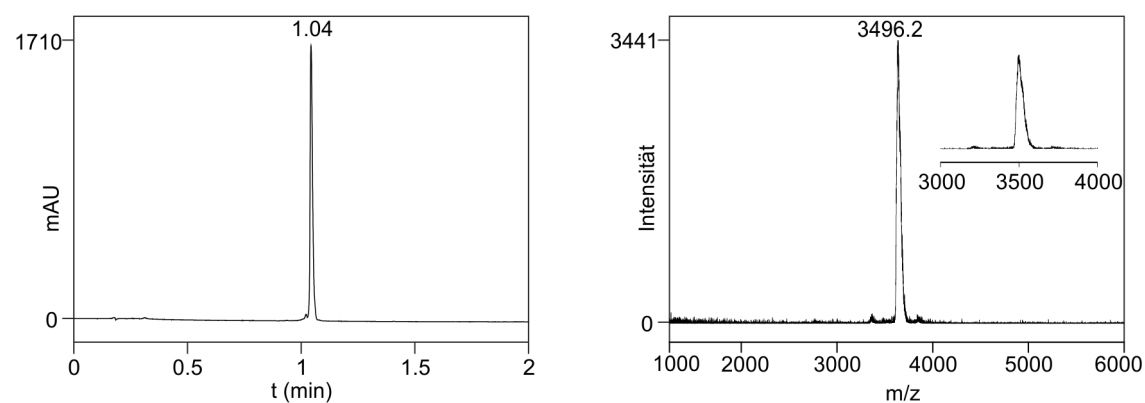
H-Ala-Cys-Pro-Ile-*aeaa*-cctacag-Lys(PEG)-NH₂ **115**:



H-Ala-Cys-Pro-Ile-Ala-Gln-Lys-cctacag-Lys(PEG)-NH₂ **116**:



PEG-Gly ttccccac-Lys(CO(CH₂)₂S-Ala-NH₂)-NH₂ **123**:



8.6 Abkürzungsverzeichnis

In der Arbeit werden DNA- und PNA-Nukleotide in der üblichen Weise durch Einbuchstaben-code (groß – DNA, klein – PNA) abgekürzt. Aminosäuren werden durch den Ein- oder Drei-buchstabencode abgekürzt.

Ac	Acetyl
ACN	Acetonitril
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
aeaa	[2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]acetyl
AFC	7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin
Alloc	Allyloxycarbonyl
Amp	Ampicillin
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease-Activating Factor 1</i>
Äq.	Äquivalent(e)
ATP	Adenosintriphosphat
a. u.	<i>arbitrary units</i>
ber.	berechnet
Bhoc	Benzhydryloxycarbonyl
BIR	<i>baculoviral LAP repeat</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CPP	<i>cell penetrating peptide</i>
Cyt C	Cytochrom C
DCM	Dichlormethan

Anhang

DIPEA	Diisopropylethylamin
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMB	<i>N,N'</i> -Dimethylbarbitursäure
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	Elektrosprayionisation
et al.	<i>et alii</i>
FAM	5,6-Carboxyfluorescein
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
HATU	2-(7-Aza-1H-benzotriazo-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HCTU	2-(6-Chloro-1H-benzotriazo-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminiumhexafluorophosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPMA	Poly(hydroxypropyl-methacrylamid)- <i>co</i> -(Methacrylat-Gly-Gly-Nitrophenylester)
LB	Luria-Bertani
MALDI/TOF	<i>matrix assisted laser desorption and ionization / time of flight</i>
MBHA	<i>para</i> -Methylbenzhydrylamin

Anhang

Mmt	Monomethoxytrityl
MS	Massenspektrometrie
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NMM	N-Methylmorpholin
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pip	Piperidin
PNA	Peptidnukleinsäure
PyBOP	(Benzotriazo-1-yloxy)tripyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
Pyr	Pyridin
r_{norm}	normierte Anisotropie
RNAi	RNA <i>interference</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Schutzgruppe
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SG	Schutzgruppe
Smac	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> mit Glucose
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> Butyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Anhang

TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
TIS	Triisopropylsilan
t_R	Retentionszeit
Trt	Trityl
UV/VIS	Ultraviolett/ <i>visible</i>
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
Z	Benzyloxycarbonyl

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Oliver Seitz für die stete Unterstützung und die konstruktiven Anregungen und Diskussionen, für schöne Gruppenausflüge und für die Möglichkeit zur Teilnahme an interessanten Konferenzen und einem spannenden Forschungsaufenthalt in Beijing, China. Für die finanzielle Unterstützung dieses Austauschprojekts danke ich dem DAAD.

Für die Erstkorrektur des Manuskripts und ihre nützlichen Anmerkungen und Diskussionen möchte ich mich bei Julia Michaelis, Melanie Fischbach, Alexander Roloff und Christian Scheibe bedanken.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Seitz für das tolle Arbeitsklima und die hilfreiche Zusammenarbeit bedanken – Motivation und Unterstützung sowie ein Feierabendbierchen waren immer garantiert. Ganz besonderer Dank gilt dabei alten wie neuen Kollegen mit denen ich das Labor teilte Julia Michaelis, Lucas Bethge, Christian Haase, Tom Grossmann, Olalla Vázquez, Takashi Kanamori, Henrik Petsulat, Miklos Veiczi, Lena Ruhe, Frauke Goudesone – immer ein bißchen Musik im Hintergrund und gute Laune haben den Forschergeist beflügelt. Hendrik Eberhard half bei der Proteinexpression und abenteuerete zusammen mit Heike Rohde und mir durch Beijing – auch dafür vielen Dank.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. Christoph Arenz und seiner Arbeitsgruppe, besonders Saskia Neubacher und Susie Redmer, für die Unterstützung bei den biologischen Arbeiten, die Bereitstellung der nötigen Laboreinrichtung und den Zellkulturen. Ganz besonders Susie Redmer hat ihr Wissen und Können mit mir geteilt und stets Zeit gehabt, wenn ich eine Frage hatte. Zudem bedanke ich mich bei Prof. Yigong Shi von der Princeton University für die Bereitstellung des BIR3-Konstrukts.

Nadine Troitzsch als Auszubildende und Chemielaborantin und Florian Heims als studentische Hilfskraft haben nützliche Zuarbeit geleistet und das ganze Labor auch bei ungeliebten Aufgaben entlastet. Auch die Zusammenarbeit mit meinen Forschungspraktikanten Henrik Petsulat, Miklos Veiczi und Karolin Materne hat viel Spaß gemacht.

Vor allem aber bin ich meinen Eltern, meiner Schwester Katja und Robert dankbar, die mich immer vorbehaltlos unterstützen und mir mit viel Liebe den nötigen Rückhalt bieten.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Anne Adams, die vorliegende Dissertation selbständig erarbeitet und verfasst zu haben. Es wurden keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet.

Unterschrift